

**Die Rolle der Claudine und ihre Bedeutung für die Bildung  
der *septate junctions* in *Drosophila melanogaster***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katharina Maria Küstner  
aus Helmstedt

1. Referent: Professor Dr. Hans-Henning Arnold  
2. Referent: apl. Professor Dr. Reinhard Schuh  
eingereicht am: 15.02.2010  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.04.2010

Druckjahr 2010

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Funktion von Epithelien	1
1.2	Zell-Zell-Verbindungen ( <i>junctions</i> ) in Vertebraten	2
1.2.1	Claudine in den Epithelien von Vertebraten	4
1.3	Epithelien in Invertebraten	7
1.3.1	Epithelien und <i>junctions</i> in <i>Drosophila</i>	7
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>12</b>
2.1	Identifizierung von potentiellen Claudinen in <i>Drosophila melanogaster</i>	12
2.1.1	Vergleich konservierter Proteinmotife zwischen den potentiellen Claudinen	13
2.1.2	Analyse von RNAi-vermittelten Phänotypen der claudinähnlichen Gene	15
2.1.2.1	Untersuchung der Lebensfähigkeit nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion	15
2.1.2.2	Phänotypen des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion	16
2.1.2.3	Der <i>liquid clearance</i> Phänotyp des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion	17
2.1.2.4	Lokalisation von Coracle nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion	20

2.1.3	Intrazelluläre Lokalisation der potentiellen Claudine	21
2.1.4	Sem ist ein weiteres potentielles Claudin in <i>Drosophila melanogaster</i>	22
<b>2.2.</b>	<b>Charakterisierung von Sem</b>	<b>25</b>
2.2.1	<i>sem</i> defiziente Embryonen haben defekte <i>septate junctions</i>	25
2.2.2	Herstellung und Isolierung <i>sem</i> mutanter Fliegenlinien	27
2.2.3	Coracle ist in <i>sem</i> mutanten Embryonen misslokalisiert	31
2.2.4	<i>sem</i> mutante Embryonen weisen ein elongiertes Tracheensystem auf	33
2.2.5	Sem ist essentiell für die Gasfüllung des Tracheensystems	34
2.2.6	Sem ist an der Barrierefunktion epithelialer Zellen beteiligt	36
2.2.7	Für die Exozytose ist eine korrekte Lokalisation von Sem notwendig	37
2.2.8	<i>Drosophila</i> -Claudine sind für den Aufbau der <i>septate junctions</i> essentiell	40
<b>2.3</b>	<b>Generierung und Charakterisierung spezifischer <i>lack of function</i> Mutationen von <i>mega</i></b>	<b>43</b>
2.3.1	<i>gene targeting</i> von <i>mega</i> durch homologe Rekombination	44
2.3.2	Charakterisierung des monoklonalen anti-Mega Antikörper	49
2.3.3	<i>mega</i> <sup>I</sup> und <i>mega</i> <sup>VIII</sup> sind Nullallele	51
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>



<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>67</b>
4.1	Puffer und Lösungen	67
4.2	Nährmedien für Fliegen	68
4.3	Nährmedien für Bakterien	68
4.4	Molekularbiologische Arbeitstechniken	69
4.4.1	Bakterienstämme	69
4.4.2	Extraktion genomischer DNA mit QIAGEN® DNeasy Tissue Kit	69
4.4.3	DNA Präparation zur Genotypbestimmung von einzelnen Organismen	69
4.4.4	Restringieren der DNA	70
4.4.5	Dephosphorylierung restringierter DNA	70
4.4.6	Ligation von DNA-Fragmenten	70
4.4.7	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	71
4.4.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	71
4.4.9	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	71
4.4.10	Bakterientransformation durch Elektroporation	72
4.4.11	Plasmid Präparationen	72
4.4.12	Analyse und Amplifikation von DNA mit der PCR	73
4.4.13	Klonierung von PCR-Fragmenten	74
4.4.14	Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung	74

4.4.15 <i>in silico</i> Sequenz-Analysen	74
4.4.16 Klonierung des P{ <i>mega-w<sup>+</sup>-mega</i> }-Konstruktes	75
<b>4.5 Färbungen an <i>Drosophila</i>-Gewebe</b>	<b>76</b>
4.5.1 Sammeln von Embryonen	76
4.5.2 Hitzefixierungen von Embryonen	76
4.5.3 Fluoreszenz-Antikörperfärbungen an Embryonen	76
4.5.4 Lumen Färbung des Tracheensystems	77
4.5.5 Herstellung von Antikörpern	78
<b>4.6 Embryologie und Genetik</b>	<b>79</b>
4.6.1 Fliegenstämme	79
4.6.2 Fliegenhaltung	79
4.6.3 Injektion von Konstrukten zur Herstellung transgener Fliegen	79
4.6.4 <i>gene replacement</i> durch homologe Rekombination	80
4.6.5 Ektopische Genexpression mithilfe des GAL4-UAS-Systems	81
4.6.6 Texas-Red <sup>®</sup> -Dextran-10kDa Injektionen in Embryonen	81
4.6.7 Elektronenmikroskopie	82
<b>4.7 Antikörper, Fliegenstämme, Oligonukleotide und Vektoren</b>	<b>83</b>
<b>4.8 Abkürzungen</b>	<b>88</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>104</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion von Epithelien

Epithelien überziehen die gesamte Körperoberfläche und kleiden alle Hohlräume und Hohlorgane aus, soweit sie mit der Außenwelt in Verbindung stehen. Dabei dient das Epithel als eine Barriere, die vor mechanischen Verletzungen, eindringenden Mikroorganismen und dem Verlust von Körperflüssigkeiten schützt. Um diese Funktion wahrzunehmen, liegen die Zellen des Epithels dicht aneinander und verfügen über zahlreiche Zellkontakte. In Folge dessen besitzt das Gewebe nur kleine Interzellulärräume mit entsprechend wenig Interzellulärsubstanz (Angelow et al., 2008).

Für die Unterscheidung der zahlreichen Epitheltypen hat es sich bewährt zwei Merkmale hervorzuheben: die Zahl der Zellschichten im Epithel und die Form der Zellen an der freien Oberfläche. Dabei unterteilt man anhand der Zahl der Zellschichten in einschichtige, mehrreihige und mehrschichtige Epithelien und anhand der Form der Zellen in kubisches und prismatisches Epithel sowie in Plattenepithel (Alberts et al., 2002).

Eine weitere Eigenschaft aller Epithelien ist ihre Polarität. Die Oberfläche des Epithels, die apikale Seite, grenzt an das gasförmige oder flüssige Außenmedium, während die gegenüberliegende basale Seite der Basalmembran aufsitzt, einer dichten Matte aus extrazellulärer Matrix. Der seitliche Bereich, der Epithelzellen untereinander verbindet, wird als lateraler Bereich bezeichnet. Diese Bereiche unterscheiden sich sowohl funktionell als auch aufgrund ihrer Transmembranproteine (Übersicht: Gibson und Perrimon, 2003). In dem lateralen Bereich von Epithelzellen finden sich die Zell-Zell-Verbindungen, die es erst ermöglichen, eine selektiv permeable Barriere zwischen den Epithelzellen aufzubauen und somit entscheidend zum Erhalt des homöostatischen Gleichgewichts beitragen (Krämer, 2000; Müller, 2000). Ferner ermöglichen sie es angrenzende Epithelzellen miteinander zu verbinden. Dadurch können Epithelien

spezialisierte Aufgaben wahrnehmen, wie Oberflächenepithelien, die beispielsweise die Haut bilden und vor allem eine Schutzfunktion erfüllen, oder den Darm auskleiden und Stoffe resorbieren können und eine Barriere bilden, die das jeweilige Organ von der Umgebung abgrenzt, oder Drüsenepithelien, die Sekrete aller Art produzieren (Findley und Koval, 2009). Die bereits erwähnten Zell-Zell-Verbindungen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

## 1.2 Zell-Zell-Verbindungen (*junctions*) in Vertebraten

Zell-Zell-Verbindungen, englisch *junctions*, sind die direkten Berührungsstellen von Zellen in Geweben. Sie übernehmen in tierischen Geweben verschiedene Aufgaben, wie die Regulation von Morphogenese und Zellmigration, feste Zellverbindungen, das Differenzieren von Geweben und die Proliferation (Übersicht: Knust und Bossinger, 2002). Alle mehrzelligen Lebewesen bilden vorübergehende oder dauerhafte *junctions*. Diese *junctions* werden im Wesentlichen durch Proteine gebildet, den Zelladhäsionsmolekülen, welche einerseits aus der Zelloberfläche herausragen und andererseits als intrazelluläre Ankerproteine einen zytoplasmatischen Plaque bilden. Sie haben die Aufgabe das Gewebe zusammenzuhalten und die Kommunikation von Zellen miteinander zu ermöglichen. Diese Proteine können Signale von außen, beispielsweise von anderen Zellen, ins Innere weiterleiten, oder Signale von einer Zelle zu ihrer Nachbarzelle weitergeben. Zelladhäsionsmoleküle vermitteln sowohl Kontakte zwischen Zellen als auch zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. *Junctions* können in drei Gruppen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden (Hartsock und Nelson, 2008).

Die erste Gruppe zellulärer Verbindungen wird als Desmosomen zusammengefasst. Sie vermitteln den elastischen und gleichzeitig starken Zusammenhalt von Geweben. Desmosomen erscheinen wie kugelförmige Verdickungen an den seitlichen Wänden von Epithelzellen. Der interzelluläre Raum ist an diesen Stellen teilweise leicht verbreitert, da er mit filamentösem Material, wie Glycoproteinen und Mukopolysacchariden, gefüllt ist. Bei Vertebraten werden Punktdesmosomen, Hemidesmosomen und Gürteldesmosomen unterschieden, wobei die

Gürteldesmosomen spezifisch für Epithelien sind und auch als *zonula adherens* oder *adherens junctions* bezeichnet werden (Rudini und Dejana, 2008). Im weiteren Verlauf wird die Bezeichnung *adherens junctions* verwendet werden.

*Adherens junctions* kommen besonders in Zellen mit intensiver mechanischer Belastung vor und verbessern den mechanischen Zusammenhalt. Sie bilden ein umlaufendes Band aus Membranproteinen, das jede Epithelzelle umgibt und mit den *adherens junctions* der Nachbarzellen in direktem Kontakt steht. Dieses Band befindet sich in der lateralen Membran direkt basal der *tight junctions* (siehe unten). *Adherens junctions* basieren auf Cadherinen, Calcium-abhängige Transmembranproteine, die mit verschiedenen Ankerproteinen, wie Cateninen, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin, mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Dadurch vermitteln sie nicht nur Adhäsion, sondern leiten auch Signale weiter (Matter und Balda, 2003b).

Eine zweite Gruppe von Zellverbindungen, die *gap junctions*, vermitteln direkte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen. Es handelt sich dabei um kanalbildende Proteinkomplexe, welche die Zytoplasmen zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden. Eine *gap junction* besteht aus zwei Halbkanälen, Connexonen, wobei jede Zelle einen Halbkanal beisteuert. Ein Connexon ist aus sechs gleichen oder sechs verschiedenen Connexinen aufgebaut. Je nach Zusammensetzung des Connexons aus den unterschiedlichen Connexinen wird ein gerichteter oder ungerichteter Austausch sowohl von geladenen als auch von ungeladenen Substanzen, wie beispielsweise organischen und anorganischen Ionen, Nukleotiden, Aminosäuren, Wasser und Glucose, erreicht. Dadurch sind diese Zellen chemisch und elektrisch gekoppelt. *Gap junctions* sind im Ruhezustand geöffnet und schließen sich innerhalb von Sekunden, wenn bestimmte Bedingungen, wie die Schädigung der benachbarten Zelle, eintreten. Sie sind bis auf wenige Ausnahmen in allen Zellen vorhanden und in Epithelzellen auf die laterale Membran beschränkt (Yao et al., 2009).

Die dritte Gruppe von *junctions* ist auf Epithelzellen beschränkt und hat die Aufgabe, das Epithel abzudichten und zu verschließen. In Vertebraten wird diese Aufgabe durch die *tight junctions* vermittelt (Hartsock und Nelson, 2008). Sie dienen zur Kontrolle des parazellulären Transportes in Vertebraten (Übersicht: Aijaz et al., 2006). Zusammen mit den *adherens junctions* bilden die *tight junctions* den *apical*

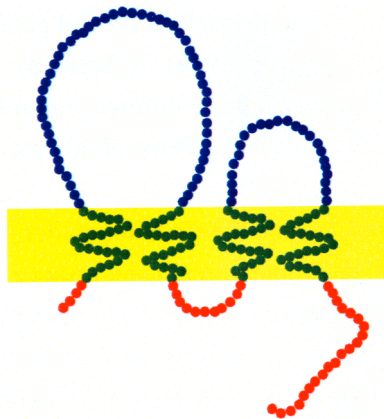
*junctional complex*, der zum ersten Mal 1963 beschrieben wurde (Farquhar und Palade, 1963). *Tight junctions* befinden sich am apikalen Ende der lateralen Membran und erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als verzweigte, die Epithelzellen vollständig umspannende Proteinbänder (Übersicht: D'Atri und Citi, 2002). Sie kontrollieren die Diffusion von Wasser, Ionen, verschiedenen Makromolekülen und den Durchlass von ganzen Zellen (Übersicht: Furuse und Tsukita, 2006). Daher können Nahrungsaufnahme und Stofftransport in Epithelien kontrolliert werden (Cereijido et al., 2008).

Zusätzlich haben diese Proteinbänder die Funktion die Diffusion von Membrankomponenten zwischen der apikalen und basolateralen Domäne zu blockieren und damit die Polarität der Epithelzellen aufrecht zu erhalten (*fence function*; Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989). Jedes *tight junctions*-Band ist aus einer Reihe von Transmembran-Proteinen zusammengesetzt (Übersicht: Fanning et al., 1999; Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Chiba et al., 2008). Auf der zytoplasmatischen Seite sind diese Transmembran-Proteine mit dem Zytoskelett verbunden und geben Signale an andere zytoplasmatische Proteine weiter (Guillemot et al., 2008). Dieser Proteinkomplex wird *tight junction-plaque* genannt (Van Itallie und Anderson, 2004). Epithelzellen können die Selektivität des parazellulären Transports durch die Regulation der *tight junctions* beeinflussen und außerdem sind *tight junctions* bei dem Weiterleiten von Signalen beteiligt (Kohler und Zahraoui, 2005; Matter und Balda, 2003b; Matter et al., 2005; Gonzalez-Mariscal et al., 2008). Bisher konnten als Transmembran-Proteine der *tight junctions* Occludin (Furuse et al., 1993; Saitou et al., 2000), die Familie der JAM- (*Junctional adhesion molecule*) Proteine (Martin-Padura et al., 1998; Itoh et al., 2001; Bazzoni, 2003; Ebnet et al., 2004) und die Claudine (Furuse et al., 1998a) identifiziert werden. Die Claudine sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.2.1 Claudine in den Epithelien von Vertebraten

Im Jahre 1998 wurden zwei *tight junctions*-Transmembran-Proteine beschrieben und angelehnt an das lateinische *claudere* (schließen) als Claudin 1 und Claudin 2 bezeichnet (Furuse et al., 1998a). Es stellte sich schnell heraus, dass diese Proteine Mitglieder einer größeren Gruppe sind. Diese besitzen vier Transmembran-Domänen

und der N- sowie der C-Terminus liegen jeweils im Zytoplasma (siehe Abb. 1.1) und sie weisen eine Größe von 20-27kDa auf (Angelow et al., 2008).



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung eines typischen Claudinproteins**

Die Aminosäuren sind als einzelne Punkte und die Zellmembran ist gelb dargestellt. Claudine besitzen vier Transmembran-Bereiche (grün), zwei extrazelluläre Schleifen (blau) und intrazellulär liegt der C- und N-Terminus sowie eine Schleife (rot).

Claudine werden mittels eines hoch konservierten Motifs von sechs Aminosäuren innerhalb der ersten extrazellulären Schleife identifiziert. Dieses wird als W-GLW-C-C-Motif, nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren, bezeichnet (Turksen und Troy, 2004; Van Itallie und Anderson, 2006). Die Gruppe der Claudine lässt sich außerdem in die PMP22/EMP/MP20-Superfamilie (*peripheral myelin protein 22*, *epithelial membrane protein-2*, *eye lens specific membrane protein 20*) einordnen (Notterpek et al., 2001; Takeda et al., 2001). Diese wird in der *pfam*-Datenbank (*protein families*) des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) als *pfam00822* bezeichnet (Bateman et al., 2002). Bei dieser Superfamilie handelt es sich um Tetraspanine, Proteine, die die Plasmamembran viermal durchqueren, und die ebenfalls 20-47kDa groß sind und das W-GLW-C-C-Motif besitzen. Mittlerweile sind 24 Claudine in Vertebraten identifiziert (Turksen und Troy, 2004). Je nach Gewebe werden verschiedene Claudine in unterschiedlichen Anteilen exprimiert (Turksen und Troy, 2004). Alle Claudine, mit Ausnahme von Claudin 12, weisen ein potentiell PDZ-Bindemotif im C-Terminus auf, das an PDZ-Domänenproteine binden kann. Das PDZ-Bindemotif im C-Terminus ermöglicht es den Claudinen direkt mit den *tight junctions* assoziierten PDZ-Domänenproteinen wie MAGUKs, ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Itoh et al., 1999), mit MUPP1 (Hamazaki et al., 2002) und mit PATJ (Roh et al., 2002) zu interagieren. Durch die Interaktionen mit den zytoplasmatischen PDZ-Domänenproteinen werden die Claudine indirekt mit dem Aktinzytoskelett verbunden und somit in den *tight junctions* stabilisiert (Muller et al.,

2006). Der zytoplasmatische Teil des C-Terminus oberhalb des PDZ-Bindemotifs ist notwendig zur Lokalisation der Claudine in dem *tight junctions* Komplex (Ruffer und Gerke, 2004) und entscheidend für die Proteinstabilität (Van Itallie et al., 2004).

Es gilt als gesichert, dass die Claudine die parazelluläre Barriere ausbilden. Durch den Austausch von Domänen zwischen Claudin 2 und Claudin 4 (Colegio et al., 2003) konnte gezeigt werden, dass die Selektivität der Claudine in der ersten extrazellulären Schleife lokalisiert ist. Genauer gesagt bestimmen die Ladungen einiger Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife der Claudine die *transepithelial electrical resistance* und die Selektivität sowie die Durchlässigkeit der Epithelien (Tsukita und Furuse, 2000; Rahner et al., 2001; Van Itallie und Anderson, 2004; Matter und Balda, 2003a; Nitta et al., 2003). Weiterhin wird die *transepithelial electrical resistance* und die Selektivität sowie die Durchlässigkeit der *tight junctions* durch posttranskriptionale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung (Nunbhakdi-Craig, et al., 2002; Ishizaki et al., 2003; Fujibe et al., 2004; Yamauchi et al., 2004; Soma et al., 2004; D'Souza, et al., 2005) sowie Palmitoylierung (Van Itallie et al., 2005) der Claudine beeinflusst. Darüber hinaus wird angenommen, dass die beiden Cysteine des W-GLW-C-C-Motifs eine Disulfidbrückenbindung eingehen und somit zur Proteinstabilität beitragen (Angelow et al., 2008).

Mittlerweile konnten im Menschen und in der Maus für verschiedene Krankheitssymptome Mutationen in Claudinen und die daraus resultierende eingeschränkte Barrierefunktion von Epithelien als Ursache identifiziert werden. So führt beispielsweise eine Mutation im *claudin 11* Gen, exprimiert im Myelin des zentralen Nervensystems, in Mäusen zu einer verzögerten Reizweiterleitung in den Nerven (Gow et al., 1999). Ist das *claudin 1* Gen in Mäusen defekt, so sterben sie wenige Stunden nach der Geburt, da sie austrocknen (Furuse et al., 2002). Eine Mutation im humanen *claudin 1* Gen führt zu schweren Hautveränderungen (Hadj-Rabia et al., 2004).



### 1.3 Epithelien in Invertebraten

Bereits die einfachsten mehrzelligen Organismen (*Metazoa*) haben Zellverbindungen und somit Epithelien entwickelt da sonst keine Abgrenzung von verschiedenen Körperbereichen möglich wäre. Alle untersuchten Epithelzellen sind polarisiert, besitzen einen Adhäsionsgürtel knapp unterhalb der apikalen Oberfläche und haben *gap junctions* (Cereijido et al., 2004). Allerdings sind die Zellverbindungen unterschiedlich aufgebaut und üben verschiedene Funktionen aus (Knust und Bossinger, 2002). *Tight junctions* sind dabei auf *Chordata* beschränkt und liegen apikal der *adherens junctions*. In Wirbellosen finden sich stattdessen *septate junctions*, die basal der *adherens junctions* liegen und sich über einen größeren Bereich der lateralen Membran erstrecken als *tight junctions*. *Septate junctions* sind die analogen Strukturen der *tight junctions* und übernehmen deren Barrierefunktion, obwohl sie strukturell nicht miteinander verwandt sind (Bellen et al., 1998; Spiegel und Peles, 2002; Bhat, 2003).

#### 1.3.1 Epithelien und *junctions* in *Drosophila*

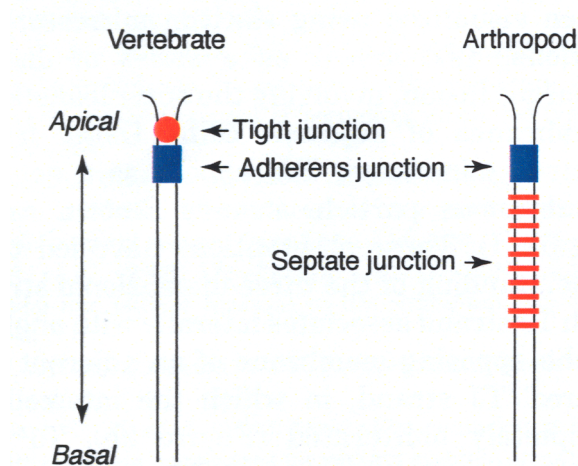
*Drosophila melanogaster*, die schwarzbäuchige Taufliege, die in dieser Arbeit als Modellorganismus dient, besitzt zwei verschiedene Arten von Epithelien. Die aus dem allerersten Epithel, dem Blastodermepithel, entstehenden Epithelien werden als primäre (ektodermale) Epithelien bezeichnet. Dazu gehören Epidermis, Vorder- und Hinterdarm, Tracheensystem, Nervensystem sowie die Speicheldrüsen. Im Gegensatz dazu entstehen die sekundären Epithelien im Verlauf der weiteren Entwicklung aus mesodermalem Gewebe, das in epitheliales Gewebe übergeht. Zu diesen gehören das Mitteldarmepithel, das Herz (*dorsal vessel*) und die Glia-scheiden, die die Blut-Nerven Barriere aufbauen (Übersicht: Tepass et al., 2001). Die Malpighischen Gefäße nehmen eine Sonderstellung ein, da sie sowohl aus Zellen der Epidermis als auch aus ursprünglich mesodermalen Zellen hervorgehen (Denholm et al., 2003). Die Epithelienentwicklung von *Drosophila* unterscheidet sich grundlegend von der Entwicklung der Epithelien in Vertebraten und kann in drei Phasen unterteilt werden (Übersicht: Tepass et al., 2001). In der ersten Phase findet die Ausbildung der Polarität während der Zellularisierung zum Blastoderm statt. Dabei

kommt es zunächst zu Zellkernteilungen ohne Teilung des Zytoplasmas. Nach neun Kernteilungsrunden bewegen sich die Zellkerne zur Zellmembran, wo weitere vier Runden von Zellkernteilungen ablaufen. Danach stülpt sich die Zellmembran ein und umwächst die ca. 5000 Zellkerne und hüllt sie ein. Dabei wird die Membran erweitert indem neues Membranmaterial einseitig eingebaut wird (Lecuit und Wieschaus, 2000). Mit der sogenannten Einstülpungsfurche ist ein kontraktiler Ring aus Aktin und Myosin sowie weiteren Proteinen assoziiert. Dieser Ring steht mit den Ringen der entstehenden benachbarten Zellen in Kontakt und somit besteht ein Netzwerk zwischen den entstehenden Zellen. Hinter der Einstülpungsfurche bilden sich die ersten *basalen adherens junctions*, und dadurch bilden die Nachbarzellen erste Zell-Zell-Kontakte aus. Die *basalen adherens junctions* bestehen aus DE-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin sowie dem PDZ-Domänenprotein Discs lost und bleiben mit der Einstülpungsfurche assoziiert, während sie zusammen mit der wachsenden Zellmembran basal wandern. Allerdings lösen sie sich wieder auf wenn die Zellularisierung beendet ist. Die *spot adherens junctions* bilden sich in der lateralen Membran und konzentrieren sich apikal.

Die zweite Phase der Epithelienentwicklung umfasst die Gastrulation und die Organogenese. Im Verlauf dieser Phase entstehen unterschiedliche funktionelle Bereiche und es findet die Erweiterung der Asymmetrie in der Polarität statt. Des Weiteren wird der *circumferential junctional complex* gebildet, der zunächst in allen Epithelien gleich aufgebaut ist und die apikalen *spot adherens junctions* bilden sich zu den *adherens junctions* aus.

In der dritten Phase der Epithelienentwicklung spezialisieren sich die verschiedenen Epithelien. Allerdings ist über den Verlauf der Spezialisierung noch nicht viel bekannt. Am Ende der Spezialisierung gibt es so unterschiedliche Epithelien wie die der Tracheen, der Speicheldrüsen und des Hinterdarms.

Epithelzellen in *Drosophila* bilden wie die Epithelien der Vertebraten einen apikalen und einen basolateralen Bereich aus. Diese werden durch die *adherens junctions* getrennt. Der apikale Bereich besteht aus der apikalen Oberfläche und der *subapical region* (Tepass, 1996). Von der Lage her entspricht die *subapical region* den *tight junctions* (siehe Abb. 1.3), und auch viele Homologe von *tight junctions* Komponenten sind hier lokalisiert. Die *subapical region* wird erst spät in der Embryogenese gebildet (Bachmann et al., 2001; Übersicht: Tepass et al., 2001; Knust und Bossinger, 2002).



**Abb. 1.2 Unterschiede in den Zellverbindungen zwischen Vertebraten und Arthropoden**

Epithelien in Vertebraten haben apikal die *tight junctions*, die für die Barrierefunktion wichtig sind, gefolgt von den *adherens junctions*, die dem Epithel mechanische Festigkeit verleihen. Bei Arthropoden sind die *adherens junctions* apikal angeordnet, gefolgt von den *septate junctions*, die hier die Barrierefunktion übernehmen, sich durch ihre leiterartige Struktur auszeichnen und sich über einen größeren Bereich als die *adherens junctions* erstrecken (Abbildung aus: Furuse und Tsukita, 2006).

***adherens junctions*:** Es werden auch in *Drosophila* zwei generelle Klassen von *adherens junctions* unterschieden, Zell-Zell- und Zell-Substrat-*adherens junctions* (Tepass und Hartenstein, 1994). Die verbreitesten *adherens junctions* sind die *spot adherens junctions*, die in allen Zellen vorkommen und die in Kontakt mit Nachbarzellen stehen. In ektodermalen Epithelien kommen außerdem Gürteldesmosomen vor, die in der Literatur mal als *zonula adherens*, meistens aber einfach als *adherens junctions* bezeichnet werden. Im Folgenden bezieht sich die Bezeichnung , *adherens junctions*' auf die *zonula adherens* der Epithelien. Die *adherens junctions* übernehmen die *fence function* der *tight junctions*, indem sie apikale von basolateralen Membranbereichen trennen (Übersicht: Tepass und Hartenstein, 1994; Tepass et al., 2001). *Adherens junctions* sind auch in *Drosophila* vom Cadherin-Catenin-Komplex aufgebaut. Das Homolog von E-Cadherin, DE-Cadherin, ist maternal im Embryo angelegt (Tepass et al., 1996). Eine besondere Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion kommt der *juxtamembrane region* im zytoplasmatischen Teil von DE-Cadherin zu, da dieser offenbar als Binderegion für regulatorische Proteine dient (Myster et al., 2003). Das Homolog von  $\beta$ -Catenin, Armadillo, hat auch in *Drosophila* neben der Bildung des Cadherin-Catenin-Komplexes die Funktion der Signalweiterleitung im Wnt-Signalweg (Loureiro und Peifer, 1998).

**septate junctions:** *Septate junctions* liegen basal der *adherens junctions* und sind durch ihre charakteristische leiterartige Struktur schon früh in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beschrieben worden (Noirot-Timotheé und Noirot, 1980). Sie bestehen aus einer rund umlaufenden Spirale, ähnlich dem Gewinde einer Schraube (Übersicht: Tepass und Hartenstein, 1994). *Septate junctions* bilden und halten die parazelluläre Barriere aufrecht, halten Zellen zusammen und spielen eine Rolle bei der Signalübertragung (Carlson et al., 2000; Lamb et al., 1998; Ward et al., 2001).

Die meisten Homologe der *tight junctions* Proteine, die zunächst beschrieben wurden, waren in *Drosophila* Bestandteil der *adherens junctions* oder der *marginal zone* (Anderson et al., 2004; Wu et al., 2004). Die ersten *septate junctions* Komponenten wiederum, die beschrieben wurden, waren keine Bestandteile der *tight junctions*. *Tight junctions* und *septate junctions* schienen daher funktionelle Analoge zu sein, die auf struktureller Ebene keine gemeinsame Grundlage haben. Dann konnten jedoch Komponenten der *septate junctions* identifiziert werden, deren Homologe in *tight junctions* lokalisiert sind. Diese Komponenten gehören zur Gruppe der Claudine (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004).

**Claudine in *Drosophila*:** Bis 2003 war es unklar, ob es in Invertebraten Claudine gibt. Homologe, die aufgrund von Sequenzvergleichen mittels Datenbanken identifiziert wurden, blieben auf Chordatiere beschränkt (Kollmar et al., 2001). Dann wurden in *C. elegans* vier claudinähnliche Proteine durch eine weniger stringente Suche mit dem BLAST-Programm identifiziert (Asano et al., 2003). Die Konservierung auf DNA-Sequenzebene ist äußerst gering und die Konservierung auf Proteinebene ist ebenfalls nicht besonders hoch und konzentriert sich vor allem auf die Transmembran-Bereiche. Im selben Jahr wurde gezeigt, dass das Protein Megatrachea (Mega) in *Drosophila* strukturelle und funktionelle Homologie zu den Claudinen in Vertebraten besitzt (Behr et al., 2003). Es war damit das erste Claudin, das in Anthropoden nachgewiesen werden konnte (Behr et al., 2003). Wenige Monate später folgte ein zweites Claudin aus *Drosophila*, Sinuous (Sinu; Wu et al., 2004). Mega und Sinu sind in ektodermalen Epithelien exprimiert und in den *septate junctions* lokalisiert. Die Phänotypen beider Mutanten ähneln sich sehr: Beide sind embryonal letal, die parazelluläre Barriere ist beeinträchtigt und die Form der Zellen

des Tracheensystems ist unregelmäßig, was zu einer Elongation und Verdickung des Dorsalstammes führt. Die Polarität der Zellen scheint jedoch weitgehend erhalten zu bleiben. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine Veränderung der Struktur der *septate junctions* sowohl in *mega* als auch in *sinu* mutanten Embryonen (weniger bis gar keine Septae) gezeigt werden (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004).

Die Claudine sind die ersten konservierten Komponenten in *tight junctions* und *septate junctions* und nehmen eine zentrale Rolle für die parazelluläre Barriere sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* ein (Übersicht: Furuse und Tsukita, 2006). Anhand weiterer *in silico* Analysen konnten fünf weitere potentielle Claudine in *Drosophila* ermittelt werden (Behr et al., 2003).

Ziel dieser Arbeit ist es zu bestimmen in wieweit diese fünf potentiellen *Drosophila*-Claudine tatsächliche Claudine sind und diese dann gegebenenfalls näher zu analysieren. Darüber hinaus soll die Funktion von Claudinen in *Drosophila* näher bestimmt werden.

## 2. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit habe ich Untersuchungen über die Familie der Claudine in *Drosophila melanogaster* vorgenommen, sowie das bisher noch nicht beschriebene Claudin Sesam (Sem) charakterisiert und funktionell analysiert. Darüber hinaus habe ich ein spezifisches *lack of function* Allel für *megatrachea* (*mega*) generiert, das den Grundstein zur *in vivo* Analyse spezifischer Claudinproteindomänen und zum Aufbau sowie zur Funktionsweise von *septate junctions* legt.

Technische Details der Durchführung und die benutzten Materialien sind dem Methodenteil (Kapitel 4) zu entnehmen.

### 2.1 Identifizierung von potentiellen Claudinen in *Drosophila melanogaster*

Bereits bei der Beschreibung der beiden *Drosophila*-Claudine Mega (Behr et al., 2003) und Sinuous (Sinu; Wu et al., 2004) wurden weitere potentielle Claudine in *Drosophila* erwähnt, die *in silico* durch BLAST-Suche und ClustalW-Analyse vorhergesagt wurden. Diese Gruppe umfasst die fünf Proteine Sem (CG1298), Kasim (CG12026), Milan (CG3770), Ali baba (CG6982) und Hot dog (CG6398; Gerlach, N., Dissertation Braunschweig 2006). Für diese fünf potentiellen Claudine wurde gezeigt, dass sie auch über die für Vertebraten typische Claudinstruktur mit vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife, sowie intrazellulären Termini verfügen. Die fünf potentiellen Claudine werden ebenfalls, wie die bekannten Claudine Mega (Behr et al., 2003) und Sinu (Wu et al., 2004), in ektodermalen Geweben exprimiert (Gerlach, N., Dissertation Braunschweig 2006). In der vorliegenden Arbeit habe ich diese fünf potentiellen Claudine auf weitere bekannte Claudinmerkmale hin überprüft, um so eine genaue Zuordnung zur Klasse der Claudine zu ermöglichen.

### 2.1.1 Vergleich konservierter Proteinmotife zwischen den potentiellen Claudinen

Claudine in Vertebraten werden mittels eines hochkonservierten Motifs in der ersten extrazellulären Schleife identifiziert, das nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren als W-GLW-C-C-Motif bezeichnet wird (Turksen und Troy, 2004; Van Itallie und Anderson, 2006).

```
Mega  PYWIES-YEETRASFKNMGLWQYCFKDFVYP-KYAFLKQFTGC---HNIFSHEYVYVIREYLLPGW
Sinu  PSWLVS DYRI TGA KLDRLGLWVHCFRSLPDVND DSQRRF FVGC RWVYDPFTTG YDEIRGFLLPAF
```

**Abb. 2.1 Sequenzvergleich der ersten extrazellulären Schleife von Mega und Sinu**

Die identischen Aminosäuren von Mega und Sinu in der ersten extrazellulären Schleife sind rot und fett dargestellt und das W-GLW-C-C-Motif ist zusätzlich unterstrichen. Sinu hat mit Mega in der ersten extrazellulären Schleife 21 identische Aminosäuren (35% Identität). Des Weiteren verfügen beide Proteine über das für Vertebraten Claudine typische W-GLW-C-C Motif.

Mega und Sinu haben das W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife und entsprechen in diesem Kriterium den Vertebratenclaudinen. Vergleicht man die Sequenz der ersten extrazellulären Schleife, so verfügen sie über 21 identische Aminosäuren, was einer Identität von 35% entspricht (siehe Abb. 2.1).

Im Folgenden vergleiche ich die erste extrazelluläre Schleife von Sem, Kasim, Milan, Ali baba und Hot dog mit der von Mega bzw. Sinu (siehe Abb. 2.2), um zu überprüfen, ob die fünf potentiellen Claudine über das für Claudine typische W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife verfügen und wie hoch die Identität mit Mega bzw. Sinu ist.

Die Identität der Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife beträgt sowohl zwischen Sem und Mega als auch zwischen Sem und Sinu 40%. Die Identität von Kasim mit Mega beträgt nur 19% und mit Sinu 25%. Milan hat mit Mega 12% Identität und mit Sinu 19%. Die Identität von Ali baba mit Mega beträgt nur 14% und mit Sinu 28%. Hot dog verfügt über 22% Identität mit Mega und 16% Identität mit Sinu (siehe Abb. 2.2).

Sem und Kasim weisen in der ersten extrazellulären Schleife das vollständige W-GLW-C-C-Motif auf, wohingegen Milan, Ali baba und Hot dog lediglich über einzelne Aminosäuren dieses Motifs verfügen (siehe Abb. 2.2). Auffällig ist

Mega	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> --ESYEETR <b>A</b> S <b>F</b> <b>K</b> <b>N</b> <u><b>GLW</b></u> <b>Q</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>F</b> <u><b>TG</b></u> <b>C</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>W</b>
Sem	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>N</b> - <b>P</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>N</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>E</b> <b>V</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>I</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>S</b> <u><b>FNGC</b></u> <b>L</b> <b>W</b> <b>V</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>F</b>
Mega	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>N</b> <u><b>GLWQ</b></u> <b>Y</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>F</b> <u><b>TG</b></u> <b>C</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>W</b>
Kim	<b>PE</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> -- <b>G</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>R</b> <u><b>LGLWQQ</b></u> <b>C</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>D</b> ----- <b>E</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>N</b> <u><b>C</b></u> <b>R</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>W</b> - <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>E</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>F</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>Q</b> --
Mega	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> - <b>E</b> <b>S</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>N</b> <u><b>GLWQ</b></u> <b>Y</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> - <b>V</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>Q</b> -- <b>F</b> <b>T</b> <u><b>G</b></u> <b>C</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>W</b> --
Milan	---- <b>T</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>L</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>Q</b> <b>G</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>C</b> <b>K</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>Q</b> - <u><b>C</b></u> <b>G</b> - <b>R</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>W</b> <b>K</b> <b>A</b>
Mega	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>N</b> <u><b>GLWQ</b></u> <b>Y</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>A</b> <b>F</b> - <b>L</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>F</b> <u><b>TG</b></u> <b>C</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>F</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>W</b>
Ali	----- <b>S</b> <b>D</b> <b>W</b> <b>R</b> - <u><b>QGL</b></u> <b>F</b> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>I</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>P</b> <u><b>GC</b></u> <b>Y</b> -- <b>W</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b> -----
Mega	----- <b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> ----- <b>E</b> <b>S</b> <b>Y</b> <b>E</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>K</b> <b>N</b> ----- <u><b>GLWQ</b></u> <b>Y</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>K</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>K</b> --- <b>Y</b> <b>A</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>K</b> <b>Q</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>G</b>
Hot	<b>T</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>W</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>V</b> <u><b>WRN</b></u> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>H</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>M</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>R</b> <u><b>GLF</b></u> <b>R</b> <b>I</b> <u><b>C</b></u> <b>P</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>T</b>
Mega	- <u><b>CHNI</b></u> -- <b>F</b> <b>S</b> -- <b>H</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>V</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>W</b> -----
Hot	<u><b>HCS</b></u> <b>N</b> <b>I</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>R</b> <b>S</b>
Sinu	<b>PS</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>R</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>N</b> --- <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>F</b> <b>V</b> <u><b>GCR</b></u> <b>W</b> <b>V</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>F</b>
Sem	<b>PY</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>L</b> <b>Q</b> <b>N</b> <b>P</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>N</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>E</b> <b>V</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>N</b> <b>N</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>I</b> <b>H</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>S</b> ---- <b>F</b> <b>N</b> <u><b>GCLW</b></u> <b>V</b> <b>F</b> <b>E</b> --- <b>E</b> <b>E</b> <b>Y</b> <b>I</b> <b>I</b> <b>H</b> <b>D</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>G</b> <b>F</b>
Sinu	<b>PS</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>R</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>F</b> <b>V</b> <u><b>GCR</b></u> <b>W</b> <b>V</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>F</b>
Kim	<b>PE</b> <u><b>W</b></u> <b>I</b> --- <b>G</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>G</b> <b>R</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>Q</b> <b>Q</b> <u><b>C</b></u> <b>Q</b> <b>R</b> ----- <b>D</b> <b>E</b> ---- <b>I</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>N</b> <u><b>C</b></u> <b>R</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>W</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>I</b> ----- <b>F</b> <b>E</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>F</b>
Sinu	- <b>PS</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>R</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>F</b> <b>V</b> <u><b>GCR</b></u> <b>W</b> <b>V</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>F</b>
Milan	<b>T</b> <b>P</b> <u><b>R</b></u> <b>W</b> <b>L</b> <b>V</b> ----- <b>G</b> <b>P</b> --- <b>A</b> <b>Q</b> <u><b>G</b></u> ----- <b>T</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>H</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>G</b> <b>I</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>R</b> <u><b>C</b></u> <b>K</b> <b>V</b> <b>M</b> <b>Q</b> <b>E</b> <b>G</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>Q</b> <b>C</b> <b>G</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>D</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>G</b> <b>L</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>S</b>
Sinu	<b>PS</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>R</b> <u><b>LGLW</b></u> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>R</b> -- <b>S</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>Q</b> <b>R</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>F</b> <u><b>GCR</b></u> <b>W</b> <b>V</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>F</b>
Ali	----- <b>S</b> <b>D</b> <b>W</b> ----- <b>R</b> <u><b>QGL</b></u> <b>F</b> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>I</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>D</b> <b>P</b> -- <b>P</b> <u><b>GC</b></u> <b>Y</b> <b>W</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>D</b> --- <b>V</b> <b>G</b> <b>Y</b> -- <b>I</b> <b>K</b> <b>A</b> <b>T</b> -----
Sinu	---- <b>PS</b> <u><b>W</b></u> <b>L</b> <b>V</b> ----- <b>S</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>R</b> <b>I</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>R</b> <b>L</b> ----- <u><b>GLW</b></u> <b>V</b> <b>H</b> <u><b>C</b></u> <b>F</b> <b>R</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>D</b> <b>V</b> <b>N</b> <b>D</b> <b>D</b> <b>S</b> <b>Q</b> -- <b>R</b> <b>R</b> <b>F</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>G</b>
Hot	<b>T</b> <b>D</b> <b>N</b> <b>W</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>V</b> <u><b>WRN</b></u> <b>Q</b> <b>I</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>F</b> <b>A</b> <b>A</b> <b>K</b> <b>H</b> <b>S</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>S</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>N</b> <b>M</b> <b>V</b> <b>K</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>Y</b> <b>T</b> <b>R</b> <b>T</b> <b>R</b> <u><b>GLF</b></u> <b>R</b> <b>I</b> <u><b>C</b></u> <b>P</b> <b>K</b> <b>E</b> <b>R</b> <b>P</b> <b>P</b> <b>V</b> <b>S</b> <b>A</b> <b>V</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>Y</b> <b>L</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>T</b> <b>H</b>
Sinu	<u><b>C</b></u> <b>R</b> - <b>W</b> <b>V</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>P</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>G</b> <b>Y</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>I</b> <b>R</b> <b>G</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>P</b> <b>A</b> <b>F</b>
Hot	<u><b>C</b></u> <b>S</b> <b>N</b> <b>I</b> <b>D</b> <b>Y</b> <b>F</b> <b>P</b> <b>Q</b> <b>A</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>E</b> <b>K</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>N</b> <b>E</b> <b>D</b> <b>A</b> <b>T</b> <b>S</b> <b>R</b> <b>L</b>

**Abb. 2.2 Sequenz der ersten extrazellulären Schleife von Mega bzw. Sinu im Vergleich zu den fünf potentiellen Claudinen**

Die identischen Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife von Mega bzw. Sinu und dem jeweiligen potentiellen Claudin sind rot und fett dargestellt und das W-GLW-C-C-Motif ist fett und unterstrichen. Sem hat mit Mega 26 identische Aminosäuren (40% Identität). Während Kasim mit Mega noch 11 identische Aminosäuren (19% Identität) hat, gibt es zwischen Milan und Mega nur 7 identische Aminosäuren (12% Identität). Ali baba und Mega haben 8 identische Aminosäuren (14% Identität). Hot dog hat schließlich 13 identische Aminosäuren (22% Identität) mit Mega. Sem und Sinu verfügen über 26 identische Aminosäuren (40% Identität). Kasim hat mit Sinu 16 identische Aminosäuren (25% Identität). Milan hat dagegen mit Sinu nur 12 identische Aminosäuren (19% Identität), wohingegen Ali baba mit Sinu 18 identische Aminosäuren (28% Identität) hat. Hot dog wiederum hat mit Sinu nur 10 identische Aminosäuren (16% Identität). Sem und Kasim verfügen über das W-GLW-C-C-Motif während Milan, Ali baba und Hot dog nur einzelne Aminosäuren dieses Motifs in der ersten extrazellulären Schleife besitzen.



weiterhin, dass Sem sowohl mit Mega als auch mit Sinu mit jeweils 40% die größte Sequenzidentität in der ersten extrazellulären Schleife aufweist. Interessanterweise ist diese sogar höher als die Sequenzidentität von Sinu mit Mega, die nur 35% beträgt. Zusammen gefasst zeigt die Sequenzanalyse, dass nur Mega, Sinu und Sem eine hohe Sequenzähnlichkeit und das W-GLW-C-C-Motif in der großen extrazellulären Schleife besitzen.

## 2.1.2 Analyse von RNAi-vermittelten Phänotypen der claudinähnlichen Gene

### 2.1.2.1 Untersuchung der Lebensfähigkeit nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion

Dank der neuen Methode RNA-Interferenz, kurz genannt RNAi, kann ein spezifischer Genfunktionsverlust analysiert werden (Fire et al., 1998). In Geweben in denen spezifische RNAi exprimiert wird, wird die entsprechende zelleigene mRNA abgebaut. Somit kann mithilfe von RNAi-Experimenten der gewebespezifische Funktionsverlust von Proteinen untersucht werden. Diese Methode verwendete ich um die Phänotypen der claudinähnlichen Gene zu analysieren.

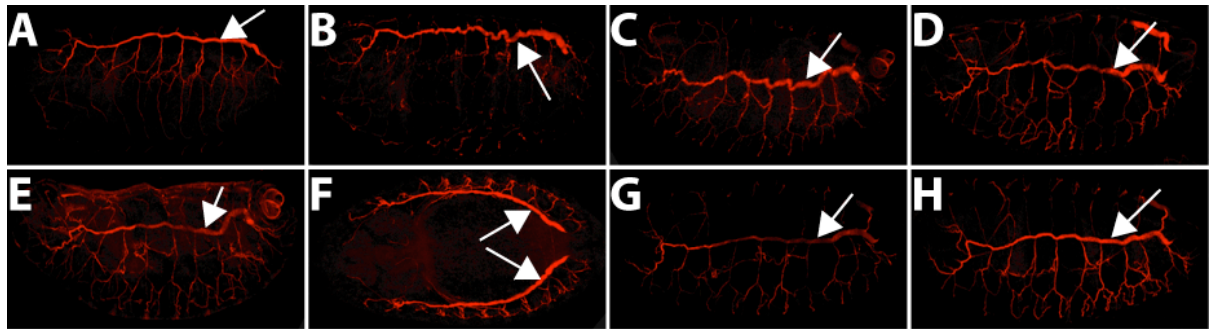
Dafür verwendete ich die RNAi-vermittelte gewebespezifische Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu*, *sem*, *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem (UAS-RNAi; btl-Gal4), in endodermalen Geweben (UAS-RNAi; Y48-Gal4) oder in mesodermalen Geweben (UAS-RNAi; mef2-Gal4; siehe 4.6.5). Dabei war die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion im Tracheensystem von *mega*, *sinu* oder *sem* letal. Zwar schlüpften Larven, die aber spätestens gegen Ende des Larvenstadiums 1 starben. Die Unterdrückung der Genfunktion von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem hatte keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit zur Folge. Die Nachkommen haben sich normal entwickelt, und es waren, verglichen mit Wildtyp-Kontrollen, gleich viele adulte Fliegen geschlüpft. Ebenso zeigte die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion in

endodermalen oder auch mesodermalen Geweben weder bei *mega*, *sinu*, *sem*, *kasim*, *milan*, *ali baba* noch *hot dog* eine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei *mega*, *sinu* und *sem* um essentielle Gene für die embryonale Tracheenentwicklung handelt.

#### 2.1.2.2 Phänotypen des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion

Von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen ist bekannt, dass sie ein elongiertes Tracheensystem aufweisen (Beitel und Krasnow, 2000). Um zu überprüfen, ob die RNAi-vermittelten trachealen Phänotypen denen von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen ähneln, führte ich Färbungen mit fluoreszent-markierter *chitin binding probe* (*cbp*; siehe 4.5.5) durch. *Cbp* bindet spezifisch an das Chitin im Tracheensystem, das im Laufe der embryonalen Entwicklung im Tracheensystem eingelagert wird und zum Ende der Embryogenese wieder abgebaut wird. Somit ist *cbp* ein ausgezeichneter Marker für die Tracheenmorphologie. Die Färbungen erfolgten an hitzefixierten Embryonen nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion in Tracheenzellen (UAS-RNAi; *btl*-Gal4; siehe 4.6.5). Dabei führte die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* im Tracheensystem zu einem elongierten Tracheenphänotyp, der vor allem im dorsalen Hauptstamm von Stadium 16 Embryonen (Stadieneinteilung nach Campos-Ortega & Hartenstein, 1997) zu erkennen ist (vergleiche Abb. 2.3 B, C und D mit A). Dies stimmt mit den beschriebenen Phänotypen *mega* oder *sinu* mutanter Embryonen gut überein (Beitel und Krasnow, 2000). Im Gegensatz dazu war nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* in Tracheenzellen kein Unterschied zur Wildtyp-Tracheenmorphologie zu erkennen (vergleiche Abb. 2.3 E, F, G und H mit A). Somit ist es möglich, sowohl für *mega* als auch für *sinu* RNAi-vermittelte Phänotypen zu erzeugen, die von den Phänotypen mutanter Tracheensysteme nicht zu unterscheiden sind. Weiterhin ist erkennbar, dass nur RNAi-vermittelte Phänotypen von *sem* den Phänotypen von *mega* oder *sinu* ähneln.



**Abb. 2.3 Phänotypen des Tracheensystems der claudinähnlichen Gene nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion**

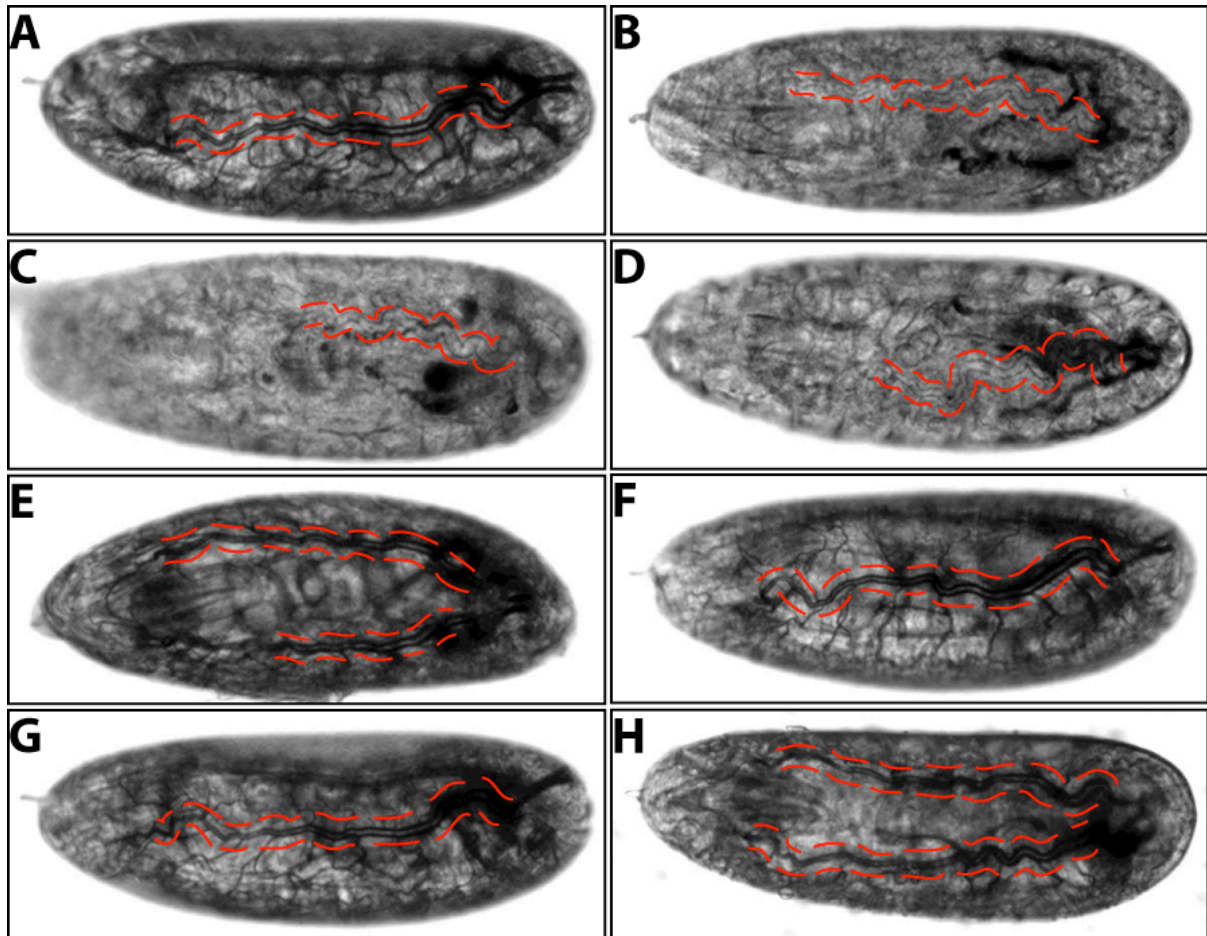
Fluoreszente *cbp* Färbung an hitzefixierten Embryonen des Stadiums 16 von Wildtypen (A) und nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion in Tracheenzellen (UAS-RNAi; btl-Gal4) von UAS-RNAi*mega* (B), UAS-RNAi*sinu* (C), UAS-RNAi*sem* (D), UAS-RNAi*kasim* (E), UAS-RNAi*milan* (F), UAS-RNAi*ali baba* (G) und UAS-RNAi*hot dog* (H). Die Embryonen (A, B, C, D, E, G und H) sind in lateraler und der Embryo (F) ist in dorsaler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links, posterior ist rechts, dorsal ist oben und ventral ist unten. Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 20x Vergrößerung, dazu kam noch 1,5facher Zoom. Im Vergleich mit dem Tracheensystem von Wildtyp-Embryonen (A) ist auffällig, dass das Tracheensystem von Embryonen nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion (UAS-RNAi;btl-Gal4) von *mega* (B), *sinu* (C) oder *sem* (D) in den Tracheenzellen elongiert ist. Dies trifft vor allem auf den dorsalen Hauptstamm zu. Im Gegensatz dazu ist das Tracheensystem nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *kasim* (E), *milan* (F), *ali baba* (G) oder *hot dog* (H) in den Zellen des Tracheensystems nicht von dem Tracheensystem von Wildtyp-Embryonen zu unterscheiden.

### 2.1.2.3 Der *liquid clearance* Phänotyp des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion

Zwei Stunden bevor *Drosophila* Larven schlüpfen sind ihre zuvor flüssigkeitsgefüllten Tracheen mit Gas gefüllt. Dieser Prozess wird als *liquid clearance* bezeichnet (Manning und Krasnow, 1993). Damit die Gasfüllung der Tracheen erfolgen kann, werden zur Mitte des Stadiums 17 zunächst die sich im Lumen der Tracheen befindlichen Proteine durch einen endozytotischen Prozess aus dem Lumen entfernt. Ungefähr eine Stunde nachdem die Proteine aus dem Tracheenlumen entfernt wurden, wird die Flüssigkeit von dem umliegenden Gewebe absorbiert. Dabei entsteht zuerst eine Gasblase mit unbekannter

Zusammensetzung in dem dorsalen Hauptstamm eines zentralen Metamers (Beitel und Krasnow, 2000). Von diesem Zeitpunkt an wird die Flüssigkeit absorbiert und die Röhren füllen sich gleichzeitig mit Gas. Die Flüssigkeit entweicht nicht durch die Atemlöcher, *Spiracles*, da erstens die Gasfüllung zu einem Zeitpunkt abläuft, zu dem die *Spiracles* noch geschlossen sind und zweitens findet *liquid clearance* auch statt, wenn der Embryo mit Öl bedeckt ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Gasfüllung und *liquid clearance* aktive Prozesse sind (Samakovlis und Uv, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Natriumpumpen eine Schlüsselfunktion beim Prozess des *liquid clearance* in Säugetieren und *Drosophila* spielen (Kellenberger und Schild, 2002; Barker und Olver, 2002; Liu et al., 2003). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es zu keiner *liquid clearance* kommt, wenn die *septate junctions* beeinträchtigt sind (persönliche Kommunikation mit Martin Jaspers). Aufgrund dieser Beobachtung habe ich Embryonen nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion claudinähnlicher Gene im Tracheensystem (UAS-RNAi; btl-Gal4; siehe 4.6.5) auf Gasfüllung überprüft. Dabei beobachtete ich bei Embryonen, die eine RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* in den Tracheenzellen hatten, kein *liquid clearance* (vergleiche Abb. 2.4 B, C und D mit A). Zwar schlüpften diese Larven, aber sie waren im ersten Larvenstadium deutlich kleiner als wildtypische Larven des gleichen Alters und sie haben sich weniger bewegt. Wie bereits erwähnt, sterben diese Larven im ersten Larvenstadium (siehe 2.1.2.1), während die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem weder die *liquid clearance* noch die Lebensfähigkeit der Larven beeinflusste (vergleiche Abb. 2.4 E, F, G und H mit A; siehe 2.1.2.1).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Mega, Sinu und Sem für eine normale *liquid clearance* notwendig sind.



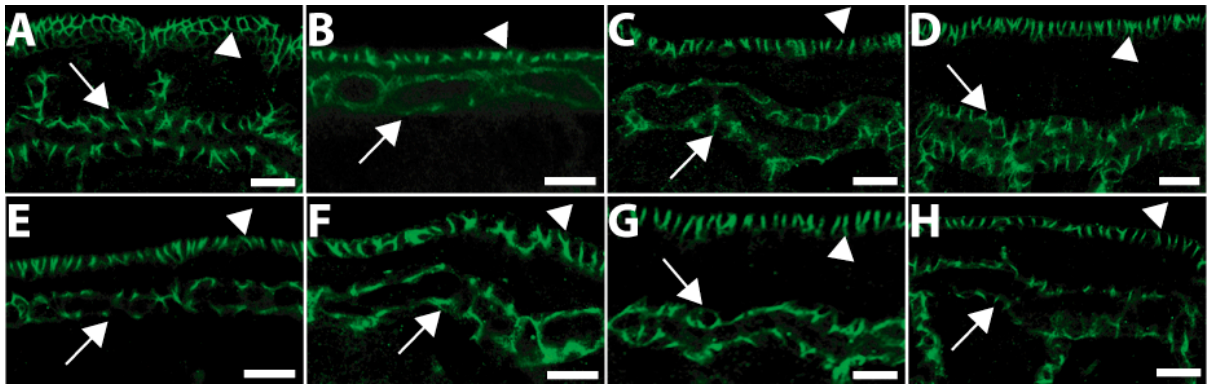
**Abb. 2.4 *Liquid clearance* Phänotypen der claudinähnlichen Gene nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion**

Durchlichtaufnahmen von Embryonen; Wildtypen (A), nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion in Tracheenzellen (UAS-RNAi; btl-Gal4) von UAS-RNAi*mega* (B), UAS-RNAi*sinu* (C), UAS-RNAi*sem* (D), UAS-RNAi*kasim* (E), UAS-RNAi*milan* (F), UAS-RNAi*ali baba* (G) und UAS-RNAi*hot dog* (H). Die rotgestrichelten Linien machen die Lage des dorsalen Hauptstamms kenntlich, sofern dieser in der Betrachtungsebene liegt. Die Embryonen (A, B, C, D, F und G) sind in lateraler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links, posterior ist rechts, dorsal ist oben und ventral ist unten. Die Embryonen (E und H) sind in dorsaler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links und posterior ist rechts. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 20x Vergrößerung, dazu kam noch 1,5facher Zoom. Bei Wildtyp-Embryonen (A) sowie bei RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *kasim* (E), *milan* (F), *ali baba* (G) oder *hot dog* (H) in den Zellen des Tracheensystems ist das Tracheensystem der Embryonen, das mit Gas gefüllt ist, eindeutig von den übrigen Geweben zu unterscheiden, da das Licht von Gas und Flüssigkeit unterschiedlich gebrochen wird. Im Gegensatz dazu ist das Tracheensystem nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *mega* (C), *sinu* (D) oder *sem* (E) in Tracheenzellen nicht mit Luft gefüllt.

#### 2.1.2.4 Lokalisation von Coracle nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion

Bisher konnte bei defekten Komponenten von *septate junctions* beobachtet werden, dass andere *septate junctions* Proteine, wie Mega (Behr et al., 2003), Sinu (Wu et al., 2004) oder Coracle (Fehon et al., 1994), nicht länger auf den Bereich der *septate junctions* beschränkt sind, sondern vielmehr über die gesamte Zellmembran gleichmäßig verteilt sind. Um zu testen, ob die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu*, *sem*, *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem ähnliche Phänotypen hervorruft, führte ich an den jeweiligen hitzefixierten Embryonen (UAS-RNAi; btl-Gal4; siehe 4.6.5) eine Antikörperfärbung mit dem *septate junctions* Marker Coracle (Fehon et al., 1994) durch. Dabei stellte ich bei der RNAi-vermittelten Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* im Tracheensystem fest, dass Coracle im Tracheensystem verglichen mit Wildtyp-Embryonen nicht mehr auf die *septate junctions* begrenzt ist (vergleiche Pfeil in Abb. 2.5 B, C und D mit Pfeil in A). Im Gegensatz dazu war Coracle im Tracheensystem noch immer auf die *septate junctions* begrenzt, wenn es zu einer RNAi-vermittelten Unterdrückung der Genfunktion von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem kam (siehe Pfeil in Abb. 2.5 E, F, G und H). Coracle ist in der Epidermis aber weiterhin auf die *septate junctions* begrenzt (siehe Pfeilspitze in Abb. 2.5 A-H).

Somit zeigen die RNAi-vermittelten Experimente, dass es nur bei *mega*, *sinu* und *sem* zur Misslokalisierung des *septate junctions* Markers Coracle kommt. Weiterhin deutet dies daraufhin, dass es sich bei *Sem*, ebenfalls wie bei *Mega* und *Sinu*, um eine essentielle *septate junctions* Komponente handeln könnte.



**Abb. 2.5 Lokalisation von Coracle nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion der claudinähnlicher Gene**

Antikörperfärbungen mit anti-Coracle-Antikörper (grün) an hitzefixierten Embryonen; Wildtyp (A) und nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion in Tracheenzellen (UAS-RNAi; btl-Gal4) von UAS-RNAi-mega (B), UAS-RNAi-sinu (C), UAS-RNAi-sem (D), UAS-RNAi-kasim (E), UAS-RNAi-milan (F), UAS-RNAi-ali baba (G) und UAS-RNAi-hot dog (H). Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch 4facher Zoom. Nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *mega* (B), *sinu* (C) oder *sem* (D) im Tracheensystem ist Coracle nicht mehr auf die *septate junctions* begrenzt (siehe Pfeil in B, C und D). Während nach einer RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *kasim* (E), *milan* (F), *ali baba* (G) oder *hot dog* (H) Coracle in den *septate junctions* des Tracheensystems lokalisiert ist wie auch in Wildtyp-Embryonen (siehe A, E, F, G und H). In allen Embryonen ist Coracle in der Epidermis in den *septate junctions* lokalisiert (siehe Pfeilspitze in A-H). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von einer Länge von 20µm.

### 2.1.3 Intrazelluläre Lokalisation der potentiellen Claudine

Bereits Nina Gerlach hat gezeigt, dass alle fünf potentiellen Claudine in den ektodermalen Geweben von *Drosophila melanogaster* Embryonen exprimiert werden (Dissertation, Braunschweig 2006). Von Vertebratenclaudinen ist bekannt, dass sie ausschließlich in den *tight junctions* lokalisiert sind (Furuse et al., 1998), während Mega und Sinu ausschließlich in den *septate junctions* von Invertebraten, den analogen Strukturen der *tight junctions*, lokalisiert sind (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004). Sem ist ebenfalls auf die *septate junctions* begrenzt (Gerlach, N. Dissertation, Braunschweig 2006), wohingegen Kasim apikal in ektodermalen Geweben lokalisiert ist (Küstner, K. Diplomarbeit, Braunschweig 2006). Ali baba ist ebenso wie Hot dog



in den *adherens junctions* konzentriert (Gerlach, N. Dissertation, Braunschweig 2006; Harder, B. Diplomarbeit Göttingen 2005). Gegen Milan gibt es keinen kommerziellen Antikörper, daher kann über seine Lokalisation innerhalb der Zelle noch keine Aussage gemacht werden. Somit kann nur für Sem, neben Mega und Sinu eine spezifische Lokalisation in den *septate junctions* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stützen damit die Vermutung, dass es sich bei Sem um ein weiteres Claudin handeln könnte.

#### **2.1.4 Sem ist ein weiteres potentielles Claudin in *Drosophila melanogaster***

Basierend auf den beschriebenen und angewandten Kriterien für Claudine in *Drosophila melanogaster* ist Sem als einziges der fünf ursprünglichen Kandidaten als ein weiteres Claudin anzusehen, da es sowohl über das W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife verfügt (siehe 2.1.1), als auch eine große Sequenzidentität zu Mega und Sinu in der ersten extrazellulären Schleife aufweist (siehe 2.1.1). Weiterhin ist die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *sem* im Tracheensystem zum Ende des ersten Larvenstadiums letal (siehe 2.1.2.1) und führt zu einem elongierten Tracheensystem (siehe 2.1.2.2). Während des Embryonalstadiums 17 füllt sich das Tracheensystem nicht mit Gas, wenn es zu einer Unterdrückung der Genfunktion von *sem* in den Tracheenzellen kommt (siehe 2.1.2.3), und Coracle, ein *septate junctions*-Marker, ist in diesen Embryonen in den Tracheenzellen misslokalisiert (siehe 2.1.2.4). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Sem über die für Vertebratenclaudine typische Struktur verfügt, in ektodermalen Geweben exprimiert wird und in den *septate junctions* lokalisiert ist (Gerlach, N. Dissertation Braunschweig 2006).

Kasim, Milan, Ali baba und Hot dog können als Claudine in *Drosophila* ausgeschlossen werden, obwohl sie über die claudintypische Struktur verfügen und in ektodermalen Geweben exprimiert werden. Dies liegt daran, dass sie bis auf Kasim nicht über das für Vertebraten typische Claudinmotif in der ersten extrazellulären Schleife verfügen (siehe 2.1.1) und verglichen mit Sem eine deutlich geringere Sequenzidentität in der ersten extrazellulären Schleife mit Mega bzw. Sinu besitzen (siehe 2.1.1). Trotz RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *kasim*, *milan*, *ali baba* und *hot dog* im Tracheensystem verhalten sich die Embryonen,



**Tabelle 2.1 Merkmale der sieben potentiellen Claudine**

Dargestellt sind die Claudineigenschaften für Sem, Kasim, Milan, Ali baba und Hot dog verglichen mit denen der beiden charakterisierten Claudine Mega (Behr et al., 2003) und Sinu (Wu et al., 2004), wobei „+“ symbolisiert, dass ein Kriterium erfüllt ist, „-“ bedeutet, dass es keine Abweichung zum Phänotyp von Wildtyp-Embryonen gibt und „k.A.“ steht für keine Angaben. Außer den beiden bekannten Claudinen Mega und Sinu weist Sem die für Claudine typischen Eigenschaften auf. Milan, Ali baba und Hot dog ähneln den Claudinen aufgrund ihrer Struktur und ihrer ektodermalen Expression. Kasim verfügt zusätzlich zu diesen beiden Merkmalen noch über das W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife, aber über keine weiteren Claudinmerkmale.

Kriterium	Mega	Sinu	Sem	Kasim	Milan	Ali baba	Hot dog
Claudin typische Struktur	+	+	+	+	+	+	+
ektodermale Expression	+	+	+	+	+	+	+
W-GLW-C-C-Motif	+	+	+	+	-	-	-
Proteinidentität der ersten extrazellulären Schleife zu Mega	/	35%	40%	19%	12%	14%	22%
Proteinidentität der ersten extrazellulären Schleife zu Sinu	32%	/	40%	25%	19%	28%	16%
letal bei RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion im Tracheensystem	+	+	+	-	-	-	-
elongiertes Tracheensystem nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion im Tracheensystem	+	+	+	-	-	-	-
<i>liquid clearance</i> des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion im Tracheensystem	+	+	+	-	-	-	-
Coracle ist nach RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion im Tracheensystem nicht mehr auf die <i>septate junctions</i> begrenzt	+	+	+	-	-	-	-
Lokalisation in den <i>septate junctions</i>	+	+	+	-	k. A.	-	-

Larven und adulten Fliegen phänotypisch wildtypisch (siehe 2.1.2.1, 2.1.2.2, 2.1.2.3 und 2.1.2.4). Des Weiteren sind Kasim (Küstner, K. Diplomarbeit Braunschweig 2006), Ali baba (Gerlach, N. Dissertation Braunschweig 2006) und Hot dog (Harder, B. Diplomarbeit Göttingen 2005) nicht in den *septate junctions* lokalisiert. Für Milan ist kein spezifischer Antikörper vorhanden, daher kann zu diesem Punkt keine Aussage getroffen werden. In Tabelle 2.1 sind die Untersuchungsergebnisse der potentiellen Claudine zusammengefasst.

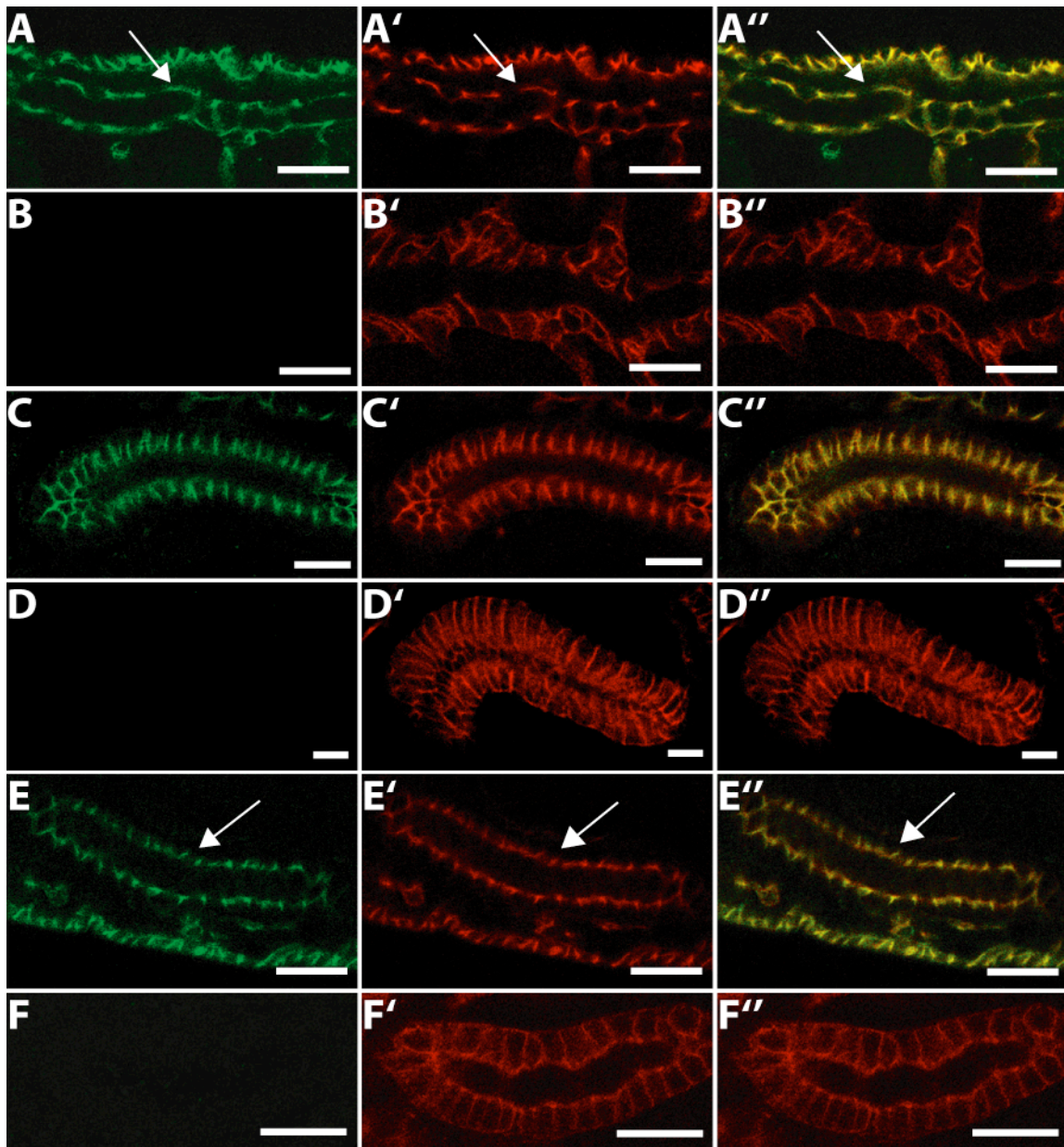
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei Sem wahrscheinlich um das dritte und einzig zusätzliche *Drosophila*-Claudin neben Mega und Sinu handelt.

## 2.2. Charakterisierung von Sem

### 2.2.1 *sem* defiziente Embryonen haben defekte *septate junctions*

Ausgehend von den bisher durchgeführten Versuchen könnte Sem ein Mitglied der Claudinfamilie sein. Für eine abschließende Beurteilung sind Analysen *sem* mutanter Embryonen unerlässlich. Daher habe ich zunächst die Defizienz *Df(2R)nap1* überprüft, die sich laut Annotation über den Bereich 41D2-E1;42A16-B1 erstreckt (siehe FlyBase) und sollte somit den Genbereich von *sem* abdecken. Diese Defizienz ist embryonal letal. Zur Überprüfung, ob die Defizienz tatsächlich *sem* deletiert und ob die *septate junctions* noch nachgewiesen werden können, habe ich an hitzefixierten Embryonen dieser Defizienz eine Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbung mit anti-Sem- und anti-Mega-Antikörpern durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich ca. 25% aller Embryonen mit Mega anfärben lassen aber nicht mit Sem. Außerdem konnte bei diesen Embryonen verglichen mit Wildtyp-Embryonen eine Misslokalisierung von Mega beobachtet werden, da Mega entlang der gesamten lateralen Membran in diesen Geweben detektiert werden kann und nicht mehr ausschließlich auf die *septate junctions* begrenzt ist. Dies ist am Beispiel der Tracheenzellen (vergleiche Abb. 2.6 B mit A), den Zellen des Hinterdarms (vergleiche Abb. 2.6 D mit C) und der Speicheldrüsenzellen (vergleiche Abb. 2.6 F mit E) gezeigt.

Dieser Sachverhalt zeigt, dass die Defizienz *Df(2R)nap1* tatsächlich das *sem* Gen deletiert und dass die *septate junctions* anscheinend nicht intakt sind. Ausgehend von diesen Erkenntnissen widmete ich mich der Herstellung einer spezifischen *sem* mutanten Fliegenlinie.



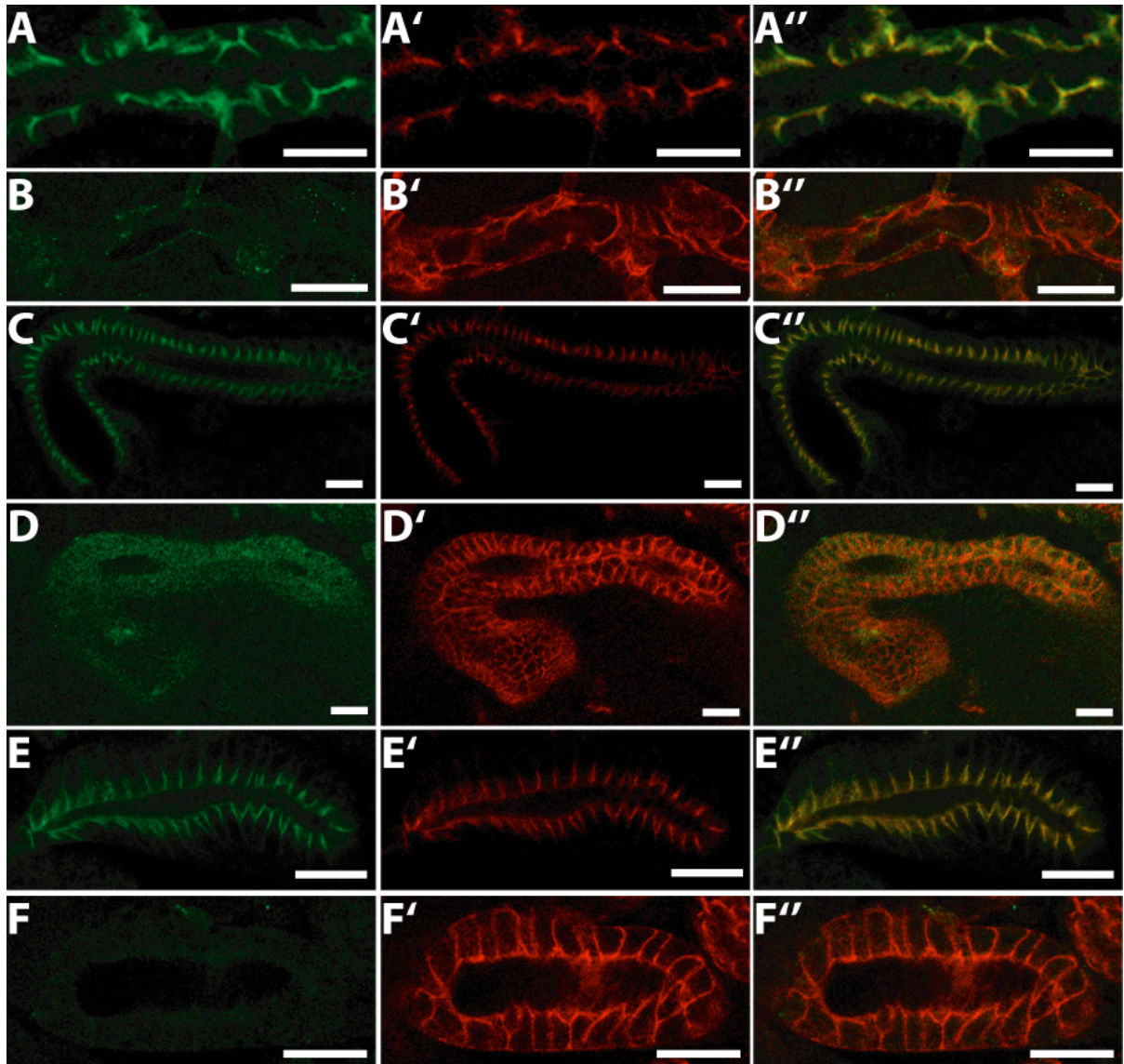
**Abb. 2.6 Sem ist in *Df(2R)nap1* Embryonen nicht detektierbar**

Anti-Sem- (grün) und anti-Mega- (rot) Antikörperfärbungen gezeigt für einen Ausschnitt des Tracheensystems (A, siehe Pfeil und B), des Hinterdarms (C und D) und der Speicheldrüsen (E, siehe Pfeil und F) an Stadium 16 Wildtyp- (A, C und E) und *Df(2R)nap1* Embryonen (B, D und F). Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch 4facher Zoom. In dem Tracheensystem (A), dem Hinterdarm (C) und den Speicheldrüsen (E) der Wildtyp-Embryonen sind Mega und Sem in den *septate junctions* kolokalisiert sind, wie die Überlagerungen des grünen und roten Kanals zeigen (A'', C'' und E''). Dahingegen ist in homozygoten *Df(2R)nap1* Embryonen kein Sem Signal detektierbar (B, D und F) und Mega ist nicht länger auf die *septate junctions* begrenzt, sondern über die gesamte Membran verteilt (B', D' und F'). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von einer Länge von 20µm.

### 2.2.2 Herstellung und Isolierung *sem* mutanter Fliegenlinien

Aufgrund der Tatsache, dass für *Sem* weder spezifische Mutanten vorhanden sind noch P-Elementinsertionslinien verfügbar sind, versuchte ich mit Hilfe von *gene replacement* durch homologe Rekombination (Gong und Golic, 2003) *sem* mutante Embryonen zu generieren (siehe 4.6.4). Bei drei unabhängigen Versuchen konnte allerdings kein *sem* Allel isoliert werden. Daher habe ich in Kooperation mit Stefan Luschnig eine Mutantenkollektion analysiert, die von der Arbeitsgruppe Luschnig (Uni Zürich) etabliert wurde. Diese Kollektion umfasst mutante Fliegenlinien, die zuvor mit dem chemischen Agens Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt wurden, das hauptsächlich Punktmutationen hervorruft. Die Fliegenlinien dieser Mutantenkollektion weisen eine Beeinträchtigung der Exozytose im Tracheensystem auf und sind letal. Da bekannt ist, dass die Exozytose im Tracheensystem auch von normalen *septate junctions* abhängig ist (Wang et al., 2006), bestand also die Möglichkeit, dass in der Mutantenkollektion auch Mutanten von *sem* enthalten sind. In der gesamten Kollektion wurden 64 mutante Fliegenlinien identifiziert, deren Mutationen wie bei *sem* auf dem zweiten Chromosom lokalisiert sind. Diese Linien wurden gegen die Defizienz *Df(2R)nap1* gekreuzt, um zu testen, ob sie über der Defizienz letal sind. Insgesamt wurden sechs Linien identifiziert, die Letalmutationen im Bereich der *sem* Defizienz tragen. Die Bezeichnung der Linien lautet: K104, O245, J219, B42, G402 und K77. Zur Überprüfung, ob in mutanten Embryonen dieser Linien noch *Sem* Protein nachgewiesen werden kann und ob die *septate junctions* intakt sind, führte ich mit hitzefixierten Embryonen dieser Linien eine Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbung mit anti-*Sem*- und anti-Mega-Antikörper als *septate junction* Marker (Behr et al., 2003) durch. Dabei konnte bei den Fliegenlinien B42 und G402 ein deutlich schwächeres und misslokalisiertes *Sem*-Signal, verglichen mit dem *Sem*-Signal in Wildtyp-Embryonen, detektiert werden. Dies zeige ich am Beispiel der Zellen des Tracheensystems (vergleiche Abb. 2.7 B mit A), des Hinterdarms (vergleiche Abb. 2.7 D mit C) und der Speicheldrüsen (vergleiche Abb. 2.7 F mit E). Außerdem war der *septate junctions* Marker Mega ebenfalls über die gesamte Membran misslokalisiert verglichen mit der Mega Lokalisierung in Wildtyp-Embryonen. Dies ist am Beispiel der Lokalisation von Mega in den Tracheenzellen (vergleiche Abb. 2.7 B' mit A'), in den Zellen des





**Abb. 2.7 Mega und Sem sind in G402 Embryonen misslokalisiert**

Anti-Sem- (grün) und anti-Mega- (rot) Antikörperfärbungen gezeigt für einen Ausschnitt des Tracheensystems (A und B), des Hinterdarms (C und D) und der Speicheldrüsen (E und F) an Stadium 16 Wildtyp- (A, C und E) und G402 Embryonen (B, D und F). Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch 4facher Zoom. In Wildtyp-Embryonen sind Sem und Mega in dem Tracheensystem (A), dem Hinterdarm (C) und den Speicheldrüsen (E) in den *septate junctions* kolokalisiert, wie aus den Überlagerungen des grünen und roten Kanals ersichtlich wird (A'', C'' und E''). Im Gegensatz dazu ist in G402 Embryonen das Sem-Signal sehr schwach und misslokalisiert (B, D und F) und Mega ist über die gesamte Zellmembran verteilt (B', D' und F'). Diese Effekte werden besonders deutlich bei der Überlagerung des grünen und roten Kanals (B'', D'' und F''). Gleiches ist für B42 zu beobachten (nicht gezeigt). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von einer Länge von 20µm.

Hinterdarms (vergleiche Abb. 2.7 D' mit C') und in den Speicheldrüsenzellen (vergleiche Abb. 2.7 F' mit E') gezeigt.

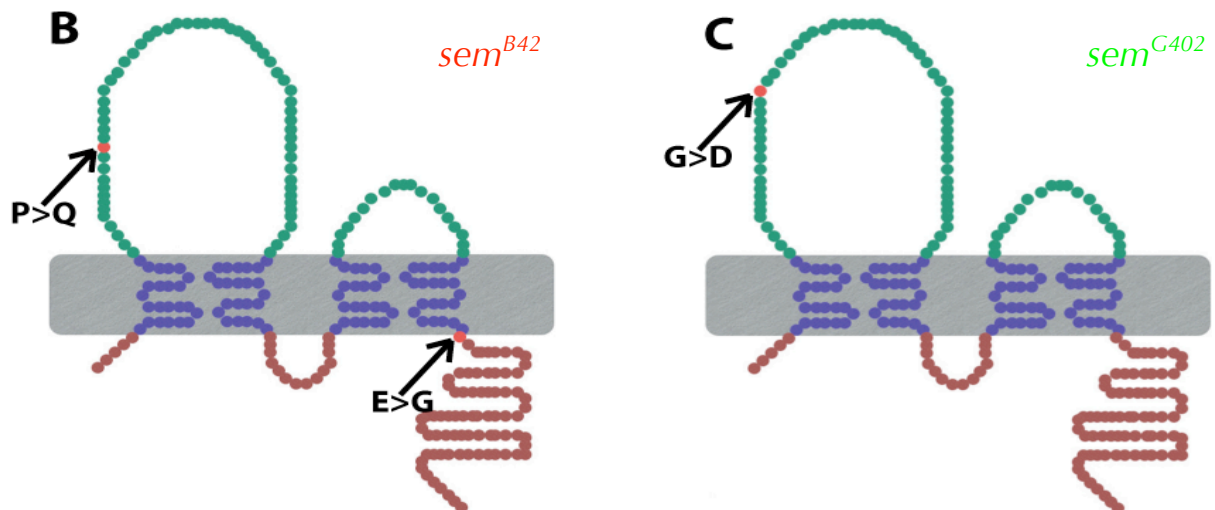
Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es sich bei den Linien B42 und G402 um *sem* mutante Allele handeln könnte.

Um diese Annahme, dass es sich bei den Fliegenlinien B42 und G402, um *sem* mutante Allele handelt, weiter zu überprüfen, testete ich ob sich die Mutationen B42 und G402 komplementieren. Die zwei Fliegenlinien B42 und G402 wurden miteinander gekreuzt, um zu testen, ob sie einer Komplementationsgruppe angehören (Greenspan, 1997). Da keine transheterozygoten Fliegen aus diesen Kreuzungen hervorgingen, komplementieren sich die Mutationen in den Fliegenlinien B42 und G402 nicht und gehören damit sie einer Komplementationsgruppe.

Zum molekularem Nachweis, dass es sich bei diesen beiden Linien um *sem* Allele handelt, wurde aus homozygoten Embryonen von B42 und G402 genomische DNA isoliert (siehe 4.4.2), der offene Leserahmen (OLR) von *sem* über PCR amplifiziert (siehe 4.4.12), kloniert (siehe 4.4.13) und sequenziert (siehe 4.4.14). Um Fehler sowohl während der Amplifikation als auch der Sequenzierung zu erkennen, führte ich drei unabhängige PCR durch und klonierte diese in den TOPO-Vektor und ließ jeweils drei Klone sequenzieren. Die Sequenzanalysen von 9 unabhängigen Klonen deckten hierbei Punktmutationen im OLR von *sem* auf. Bei B42 führt ein Nukleotidaustausch zum Aminosäurenaustausch von Prolin (P) zu Glutamin (Q) in der ersten extrazellulären Schleife in Position 41 und ein weiterer Nukleotidaustausch im N-Terminus zum Aminosäurenaustausch von Glutaminsäure (E) zu Glycin (G) Position 191 (siehe Abb. 2.8 A und B), während bei G402 ein Nukleotidaustausch einen Aminosäurenaustausch von Glycin (G) zu Asparaginsäure (D) in der ersten extrazellulären Schleife Position 47 bewirkte (siehe Abb. 2.8 A und C). Der einzelne Aminosäureaustausch in der Linie G402 von G zu D betrifft das W-GLW-C-C-Motif. Daraus kann geschlossen werden, dass dieses von Invertebraten bis zu Vertebraten konservierte Motif essentiell für die Proteinfunktion ist.

**A**

A																					M	
CAC	ACT	TTA	GGG	CGT	GTT	ATT	TTC	CAA	GCC	GAC	TTG	TTA	ACG	AAA	TTT	TTA	TAG	AAA	TAA	CAA	ATG	66
G	A	S	N	R	I	L	Q	V	A	L	C	A	S	V	F	S	L	I	C	F	V	
GGT	GCG	TCC	AAC	CGC	ATT	TTA	CAA	GTT	GCC	CTT	TGC	GCG	TCC	GTG	TTT	TCC	CTA	ATA	TGT	TTT	GTT	132
																					Q	
																					CAG	
I	A	F	S	T	P	Y	W	L	V	T	D	G	R	L	Q	N	P	R	F	T	N	
ATC	GCG	TTT	TCC	ACG	CCT	TAT	TGG	CTG	GTT	ACA	GAC	GGC	AGA	TTA	CAA	AAC	CCG	CGA	TTC	ACT	AAC	198
																					D	
																					GAC	
L	G	L	W	E	V	C	F	N	N	F	Q	D	I	H	R	F	F	D	N	S	F	
CTA	GGC	CTT	TGG	GAA	GTT	TGT	TTC	AAC	AAC	TTC	CAG	GAC	ATA	CAC	CGA	TTT	TTT	GAC	AAT	TCC	TTT	264
N	G	C	L	W	V	F	E	E	E	Y	Y	I	I	H	D	F	L	L	P	G	F	
AAC	GGA	TGC	CTA	TGG	GTT	TTC	GAA	GAG	GAA	TAT	TAC	ATC	ATA	CAC	GAC	TTC	CTC	CTG	CCT	GGC	TTC	330
Y	I	S	V	Q	L	F	A	T	L	C	F	V	M	C	L	V	V	I	P	L	T	
TAC	ATA	TCC	GTT	CAA	CTT	TTT	GCT	ACG	CTA	TGC	TTT	GTA	ATG	TGC	CTT	GTT	GTT	ATA	CCA	CTC	ACT	396
V	A	F	L	R	T	S	R	D	D	D	R	Y	M	V	L	L	L	A	I	G	S	
GTA	GCA	TTT	CTT	CGC	ACT	TCT	CGC	GAT	GAT	GAC	AGG	TAC	ATG	GTG	CTC	CTG	CTG	ATG	GGA	TCA	462	
C	Q	V	V	G	S	V	F	G	F	I	A	V	V	I	F	G	A	K	G	D	S	
TGC	CAG	GTT	GTG	GGC	TCT	GTT	TTC	GGG	TTT	ATT	GCT	GTG	GTC	ATT	TTT	GGC	GCC	AAA	GGA	GAT	TCT	528
R	D	W	M	P	G	W	Q	N	N	D	M	G	W	S	F	A	L	G	V	V	G	
CGG	GAT	TGG	ATG	CCA	GGA	TGG	CAG	AAC	AAT	GAT	ATG	GGC	TGG	TCA	TTT	GCT	CTG	GGC	GTT	GTT	GGC	594
																					G	
																					GGA	
A	V	L	L	L	P	S	G	V	L	Y	L	V	E	A	R	R	E	R	Y	K	R	
GCT	GTG	CTG	CTA	CTG	CCG	TCT	GGC	GTA	CTC	TAT	CTA	GTA	GAA	GCG	CGT	CGG	GAA	AGG	TAC	AAG	CGC	660
L	N	E	I	S	N	R	E	I	S	E	Y	G	D	E	Y	Y	Q	N	Q	G	P	
TTA	AAC	GAA	ATC	AGC	AAT	CGG	GAG	ATC	AGT	GAA	TAC	GGA	GAT	GAG	TAT	TAC	CAG	AAT	CAG	GGA	CCC	726
S	A	V	L	P	T	A	P	S	P	Y	Q	S	Y	F	A	S	E	P	S	R	P	
TCC	GCA	GTG	CTT	CCG	ACC	GCT	CCA	TCG	CCA	TAT	CAA	TCC	TAT	TTT	GCA	TCT	GAG	CCA	AGC	CGA	CCA	792
R	R	P	Q	Q	S	S	A	S	N	S	A	V	Q	G	G	I	Q	T	D	I	STOP	
AGA	AGA	CCC	CAA	CAA	AGT	AGT	GCA	TCG	AAT	TCC	GCT	GTA	CAA	GGA	GGA	ATT	CAA	ACA	GAT	ATA	TAA	858
ATC	AAA	AAT	GAA	TTC	GAA	GGA	ATT	ATC	CGT	CCA	TTT	ACA	CAA	TAT	TTA	ATA	ATA	ATT	AAC	AAA	TAT	924
ACA	AAT	ATA	TAC	GAT	GTA	AGG	TAG	AAT	AGT	CAT	TCC	ACT	AAA	TCC	ACT	ACA	AAT	GTT	TTT	AAA	ATG	999
TAT	CGA	ATT	CGA	AGG	TAA	TAA	ATA	TTT	GTC	AAA	TAA										1026	



**Abb. 2.8** Genomische Sequenz von *sem* mit den Mutationsorten von *sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup>

(A) Der kodierende Bereich von *sem* besteht aus einem einzelnen Exon. In der Fliegenlinie *sem*<sup>B42</sup> (rot) führte ein Nukleotidaustausch von C zu A zu einem Aminosäureaustausch von Prolin (P) zu Glutamin (Q) in Position 41 und ein weiterer Nukleotidaustausch von A zu G zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (E) zu Glycin (G) in Position 191. In der Fliegenlinie *sem*<sup>G402</sup> gab es dagegen nur einen Nukleotidaustausch von G zu A und somit einen Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Asparaginsäure (D) in Position 47. Schematisch Darstellung der (B) *sem*<sup>B42</sup> und (C) *sem*<sup>G402</sup> Mutante. In rot sind die ausgetauschten Aminosäuren dargestellt.

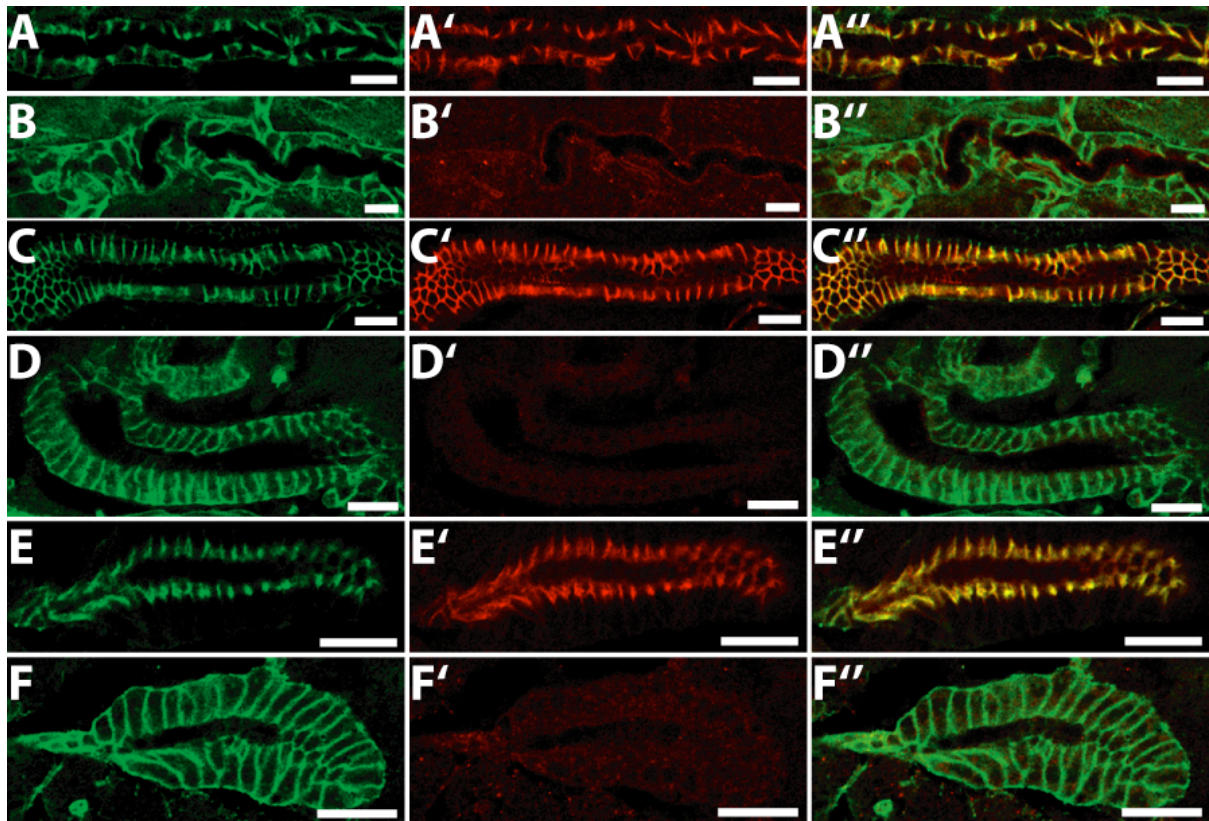


Die Mutationen bewirken somit einen Aminosäureaustausch (G402) beziehungsweise den Austausch von zwei Aminosäuren (B42) im Sem Protein und verursachen ein schwaches und misslokalisiertes Sem Signal in embryonalen mutanten Zellen. Bei Embryonen beider Mutationen ist außerdem Mega nicht auf die *septate junctions* beschränkt, sondern entlang der gesamten lateralen Zellmembran misslokalisiert, was darauf hin deutet, dass die *septate junctions* nicht intakt sind. Somit handelt es sich bei den mutanten Linien B42 und G402 um *sem* Allele und sie werden folgend als *sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup> bezeichnet. Die molekularen Ursachen der *sem* Allele ähneln den Mutanten *mega*<sup>VE896</sup> und *mega*<sup>EA97</sup>, die ebenfalls durch EMS erzeugt wurden. Wie bei den *sem* Allelen führt auch bei den *mega* Allelen der Austausch einzelner Aminosäuren zum vollständigen Funktionsverlust (Behr et al., 2003).

### 2.2.3 Coracle ist in *sem* mutanten Embryonen misslokalisiert

Anscheinend sind in *sem* mutanten Embryonen die *septate junctions* nicht mehr intakt, da Mega, ein Bestandteil der *septate junctions*, in diesen Embryonen über die gesamte laterale Membran verteilt ist. Da *mega* mutante Embryonen eine Misslokalisierung von *septate junctions* Markern wie Coracle, Fasciclin III und Neurexin aufweisen (Behr et al., 2003), interessierte ich mich für die Lokalisation des *septate junctions* Markers Coracle (Fehon et al., 1994) in den ektodermalen Geweben *sem* mutanter Embryonen. Hierfür führte ich Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit anti-Sem-Antikörpern, zur Identifizierung *sem* mutanter Embryonen, und mit anti-Coracle-Antikörpern an hitzefixierten *sem* mutanten und Wildtyp-Embryonen durch. Dafür verwendete ich *sem* defiziente Embryonen (*Df(2R)nap1 / Df(2R)nap1*), homozygote Embryonen beider *sem* Allele (*sem*<sup>B42</sup>/*sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup>/*sem*<sup>G402</sup>) und transheterozygote *sem* mutante Embryonen (*Df(2R)nap1 / sem*<sup>B42</sup>, *Df(2R)nap1 / sem*<sup>G402</sup> und *sem*<sup>B42</sup>/*sem*<sup>G402</sup>). Verglichen mit Wildtyp-Embryonen ist Coracle in *sem* mutanten Embryonen innerhalb der Zellen des Tracheensystems (vergleiche Abb. 2.9 B mit A), des Hinterdarms (vergleiche Abb. 2.9 D mit C) und der Speicheldrüsen (vergleiche Abb. 2.9 F mit E) stark misslokalisiert. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die *septate junctions* in den untersuchten *sem* mutanten Embryonen nicht intakt sind und Sem sich in diesem mutanten Phänotyp genauso wie Mega und Sinu verhält (Behr et

al., 2003; Wu et al., 2004). Um diese Aussage zu unterstützen, betrachtete ich daraufhin den Phänotyp des Tracheensystems *sem* mutanter Embryonen.

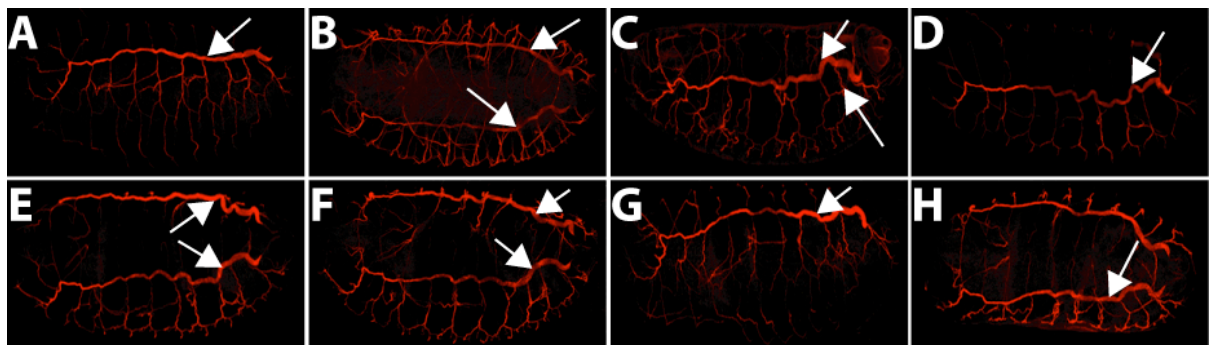


**Abb. 2.9 Coracle ist in den *sem* mutanten Embryonen misslokalisiert**

Anti-Coracle- (grün) und anti-Sem- (rot) Antikörperfärbung gezeigt für einen Ausschnitt des Tracheensystems (A und B), des Hinterdarms (C und D) und der Speicheldrüsen (E und F) an Stadium 16 Wildtyp- (A, C und E) oder *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (B, D und F). Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch 4facher Zoom. In Wildtyp-Embryonen sind Coracle (A, C und E) und Sem (A', C' und E') in dem Tracheensystem (A), dem Hinterdarm (C) und den Speicheldrüsen (E) in den *septate junctions* kolokalisiert, wie aus den Überlagerungen des grünen und roten Kanals ersichtlich wird (A'', C'' und E''). Während in den Embryonen des *sem* Allels *sem<sup>B42</sup>* Coracle (B, D und F) in den Zellen des Tracheensystems (B), des Hinterdarms (D) und der Speicheldrüsen (F) über die gesamte Membran misslokalisiert ist und Sem kaum mehr nachzuweisen ist (B', D' und F'). Gleiches konnte in Färbungen an hitzefixierten *sem* defizienten Embryonen (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*), an homozygoten *sem* mutanten Embryonen (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>*) und an transheterozygoten *sem* mutanten Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*) beobachtet werden (nicht gezeigt). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 20μm.

### 2.2.4 *sem* mutante Embryonen weisen ein elongiertes Tracheensystem auf

Nicht intakte *septate junctions*, wie sie beispielsweise für *mega* (Behr et al., 2003) und *sinu* mutante Embryonen (Wu et al., 2004) beschrieben sind, zeigen auch einen elongierten Tracheenphänotyp. Daher interessierte ich mich, ob dies ebenfalls auf *sem* mutante Embryonen zutrifft. Wie ich bereits zeigte, entsteht ein elongiertes Tracheensystem bei RNAi-vermittelter Unterdrückung der Genfunktion von *sem* in Tracheenzellen (UAS-RNAi; *btl*-Gal4). Um das Lumen des Tracheensystems anzufärben verwendete ich *cbp* (siehe 4.5.5), das an Chitin im Lumen des Tracheensystems bindet und durch sein Fluorochrom detektierbar ist. Die Experimente wurden an hitzefixierten *sem* defizienten Embryonen (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*), an homozygoten Embryonen beider *sem* Allele (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>* und *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>*) und an transheterozygoten *sem* mutante Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*) durchgeführt.



**Abb. 2.10 Phänotypen des Tracheensystems der *sem* mutanten Embryonen**

*cbp*-Färbung (rot) von Stadium 16 Wildtyp- (A und B), *Df(2R)nap1/Df(2R)nap1* (C), *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>* (D), *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* (E), *Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>* (F), *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* (G) und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (H). Die Embryonen (A, C, D und G) sind in lateraler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links, posterior ist rechts, dorsal ist oben und ventral ist unten. Die Embryonen (B, E, F und H)) sind in dorsaler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links und posterior ist rechts. Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 20x Vergrößerung, dazu kam noch 1,5facher Zoom. *Cbp* färbt das Chitin im Lumen des Tracheensystems an. Im Vergleich zu dem Tracheensystem von Wildtyp-Embryonen (A und B) ist das Tracheensystem von *sem* defizienten (C) sowie homozygoten (D und E) und transheterozygoten *sem* mutanter Embryonen (F-H) elongiert. Dies trifft sowohl auf den dorsalen Hauptstamm als auch auf die davon abzweigenden Äste zu.

*Sem* mutante Embryonen haben im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen einen elongierten dorsalen Hauptstamm und die davon abzweigenden Äste sind ebenfalls elongiert (vergleiche Abb. 2.10 C, D, E, F G und H mit A und B). Das ist ein Zeichen dafür, dass auch in *sem* mutanten Embryonen neben den beeinträchtigten *septate junctions*, die Morphologie des Tracheensystems beeinträchtigt ist.

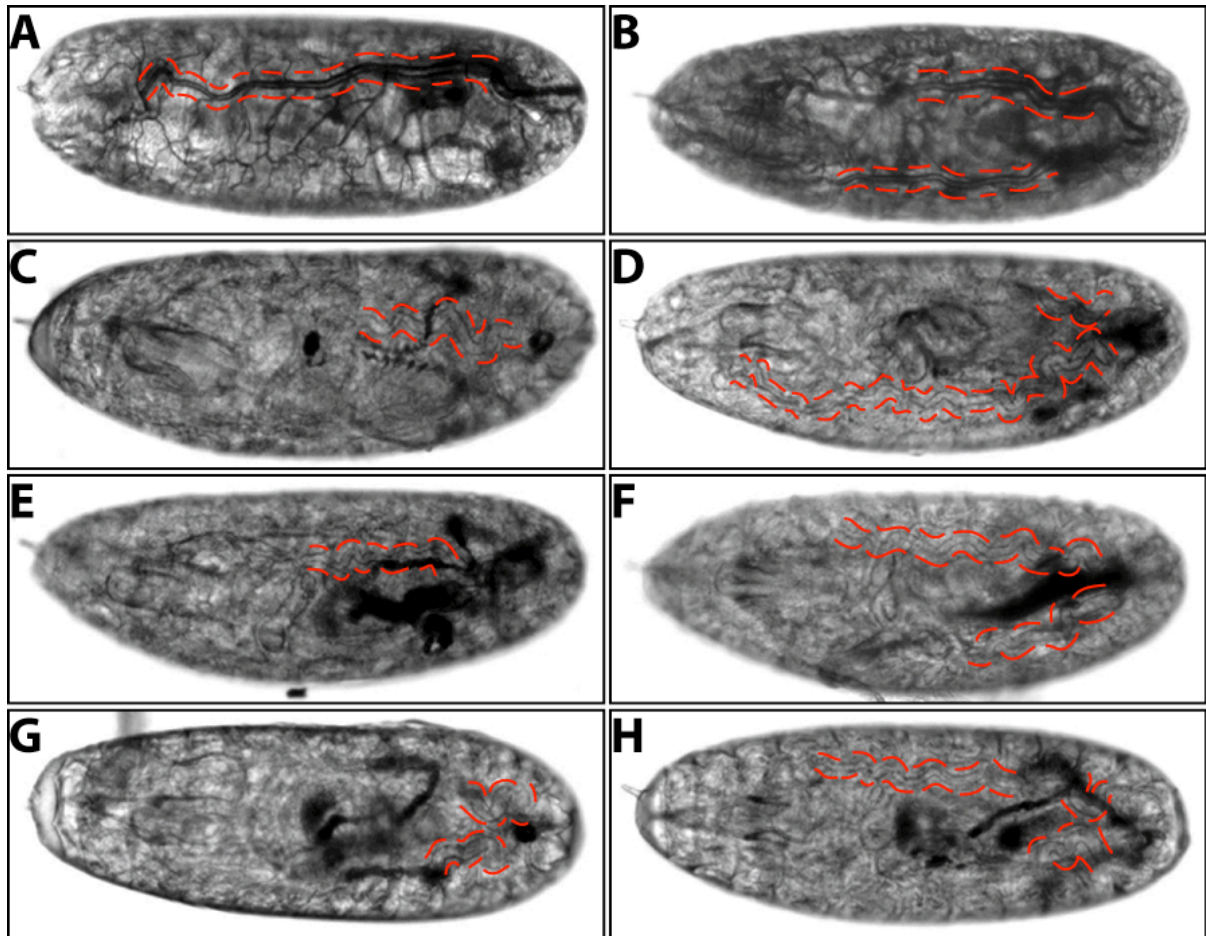
### 2.2.5 *Sem* ist essentiell für die Gasfüllung des Tracheensystems

Wie ich bereits beschrieben habe, füllt sich das zuvor flüssigkeitsgefüllte Tracheensystem im embryonalem Stadium 17 mit Gas, ein Prozess der als *liquid clearance* bezeichnet wird (Manning und Krasnow, 1993). Um die bisherige Annahme, dass *septate junctions* anscheinend etwas mit der Gasfüllung zu tun haben, zu stützen, analysierte ich unterschiedliche *sem* mutante Embryonen auf ihren *liquid clearance* Phänotyp. Im Gegensatz zu Wildtyp-Embryonen (siehe Abb. 2.11 A und B) konnte kein tracheales *liquid clearance* in *sem* defizienten Embryonen (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*, siehe Abb. 2.11 C und D), in homozygoten Embryonen beider *sem* Allele (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>*, siehe Abb. 2.11 E; *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.11 F) und in transheterozygoten *sem* mutanten Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, siehe Abb. 2.11 G; *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.11 H; *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.11 I) beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sind mit den Daten aus 2.1.2.3 konsistent, die auch zeigen, dass es bei Embryonen mit einer RNAi-vermittelten Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* in Tracheenzellen zu keiner Gasfüllung kommt (siehe Abb. 2.4 C, D und E). Allerdings sind *mega*, *sinu* oder *sem* mutante Embryonen bereits embryonal letal (Beitel und Krasnow, 2000), während eine RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* in den Zellen des Tracheensystems erst zum Ende des ersten Larvenstadiums letal ist (siehe 2.1.2.1).

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die *septate junctions* am Vorgang der *liquid clearance* beteiligt sind, und dass die frühe Letalität *sem* mutanter Embryonen nicht durch den gestörten Prozess der *liquid clearance* verursacht wird.





**Abb. 2.11 Liquid clearance Phänotyp *sem* mutanter Embryonen**

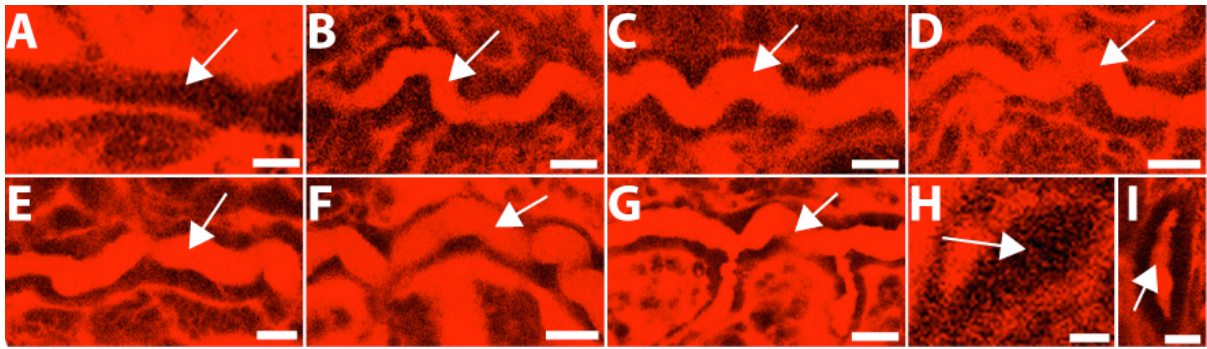
Gezeigt ist das Tracheensystem von Stadium 17 Wildtyp- (A und B), *Df(2R)nap1/Df(2R)nap1* (C), *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>* (D), *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* (E), *Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>* (F), *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* (G) und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (H) in Durchlicht aufgenommen. Die rotgestrichelten Linien machen die Lage des dorsalen Hauptstamms kenntlich, sofern dieser in der Betrachtungsebene liegt. Die Embryonen (A, C und E) sind in lateraler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links, posterior ist rechts, dorsal ist oben und ventral ist unten. Die Embryonen (B, D, F, G und H) sind in dorsaler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links und posterior ist rechts. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 20x Vergrößerung, dazu kam noch 1,5facher Zoom. In Wildtyp-Embryonen (A und B) ist das Tracheensystem gut vom restlichen Gewebe zu unterscheiden aufgrund da das Licht an den gasgefüllten Tracheen und dem übrigen Geweben unterschiedlich gebrochen wird. Bei *sem* defizienten Embryonen (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*, C und D), *sem* homozygoten Embryonen beider *sem* Allele (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>*, E; *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>*, F) und transheterozygoten *sem* mutanten Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, G; *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>*, H; *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*, I) ist das flüssigkeitsgefüllte Tracheensystem kaum von den restlichen Geweben zu unterscheiden.

### 2.2.6 Sem ist an der Barrierefunktion epithelialer Zellen beteiligt

Die transepitheliale Barriere wird in Vertebraten durch Claudine in den *tight junctions* vermittelt (Furuse et al., 2002). In Invertebraten wird die Funktion der transepitheliale Barriere durch die den *tight junctions* analoge Struktur, den *septate junctions*, ausgeübt. In den *septate junctions* sind die *Drosophila*-Claudine lokalisiert und es konnte sowohl für *mega* (Behr et al., 2003) als auch für *sinu* mutante Embryonen (Wu et al., 2004) gezeigt werden, dass die Barrierefunktion der Epithelien beeinträchtigt ist. Daher betrachtete ich die transepitheliale Barriere *sem* mutanter Embryonen genauer.

Zur Analyse der Barrierefunktion in *sem* mutanten Embryonen injizierte ich Texas Red®-Dextran (4.66), ein Fluorochrom mit einem Molekulargewicht von 10kDa, in lebende Embryonen des Stadium 17 aus heterozygoten Ablagen. Die Identifizierung *sem* mutanter Embryonen erfolgte nach der Injektion am konfokalen Mikroskop, anhand des charakteristischen elongierten Tracheensystems. Nach Injektion breitet sich der Farbstoff innerhalb weniger Minuten im Körper des Embryos aus. Allerdings kann er nicht die transepitheliale Barriere von Epithelien wie dem Tracheensystem und den Speicheldrüsen passieren. Ein Defekt der transepithelialen Barriere führt dazu, dass der Farbstoff durch den parazellulären Transport in das Lumen dieser Epithelien gelangt. In *sem* defizienten Embryonen (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*, siehe Abb. 2.12 B), homozygoten Embryonen beider *sem* Allele (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>*, siehe Abb. 2.12 C; *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.12 D und I) und transheterozygoten *sem* mutante Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, siehe Abb. 2.12 E; *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.12 F; *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*, siehe Abb. 2.12 G) kommt es unmittelbar nach Injektion des Farbstoffs tatsächlich zu einer Füllung des Tracheen- und Speicheldrüsenlumens. Im Gegensatz dazu ist dies bei Wildtyp-Embryonen selbst 60 min nach Injektion nicht der Fall (siehe Abb. 2.12 A und H).

Dies macht deutlich, dass Sem ebenso wie die *Drosophila*-Claudine Mega und Sinu an der Etablierung der transepithelialen Barriere beteiligt ist..



**Abb. 2.12 Sem ist an der Barrierefunktion transepithelialer Gewebe beteiligt**

Fluoreszenzaufnahmen des Tracheensystems und der Speicheldrüse von lebenden Stadium 17 Embryonen 10 min nach der Injektion von Texas-Red®-Dextran-10kDa in den posterioren Pol von Wildtyp- (A und H), *Df(2R)nap1/Df(2R)nap1* (B), *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>* (C), *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* (D und I), *Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>* (E), *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* (F) und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (G), wobei jeweils ein Ausschnitt von dem Tracheensystem bzw. der Speicheldrüse gezeigt ist. Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch 4facher Zoom. In Wildtyp-Embryonen ist im Lumen des Tracheensystems (A) und der Speicheldrüsen (H) kein Farbstoff erkennbar (siehe Pfeilspitze). Dies zeigt, dass die parazelluläre Barriere beider Gewebe intakt ist. Im Gegensatz dazu ist das Tracheensystem von *Df(2R)nap1/Df(2R)nap1* (B), *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>* (C), *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* (D), *Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>* (E), *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* (F) und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (G) unmittelbar nach der Injektion von Texas-Red®-Dextran-10kDa mit Farbstoff gefüllt (siehe jeweilige Pfeilspitze). Ebenso ist das Lumen der Speicheldrüsen *sem* mutanter Embryonen unmittelbar nach der Injektion mit Farbstoff gefüllt; gezeigt für *sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>* Embryonen (I, siehe Pfeilspitze). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 20μm.

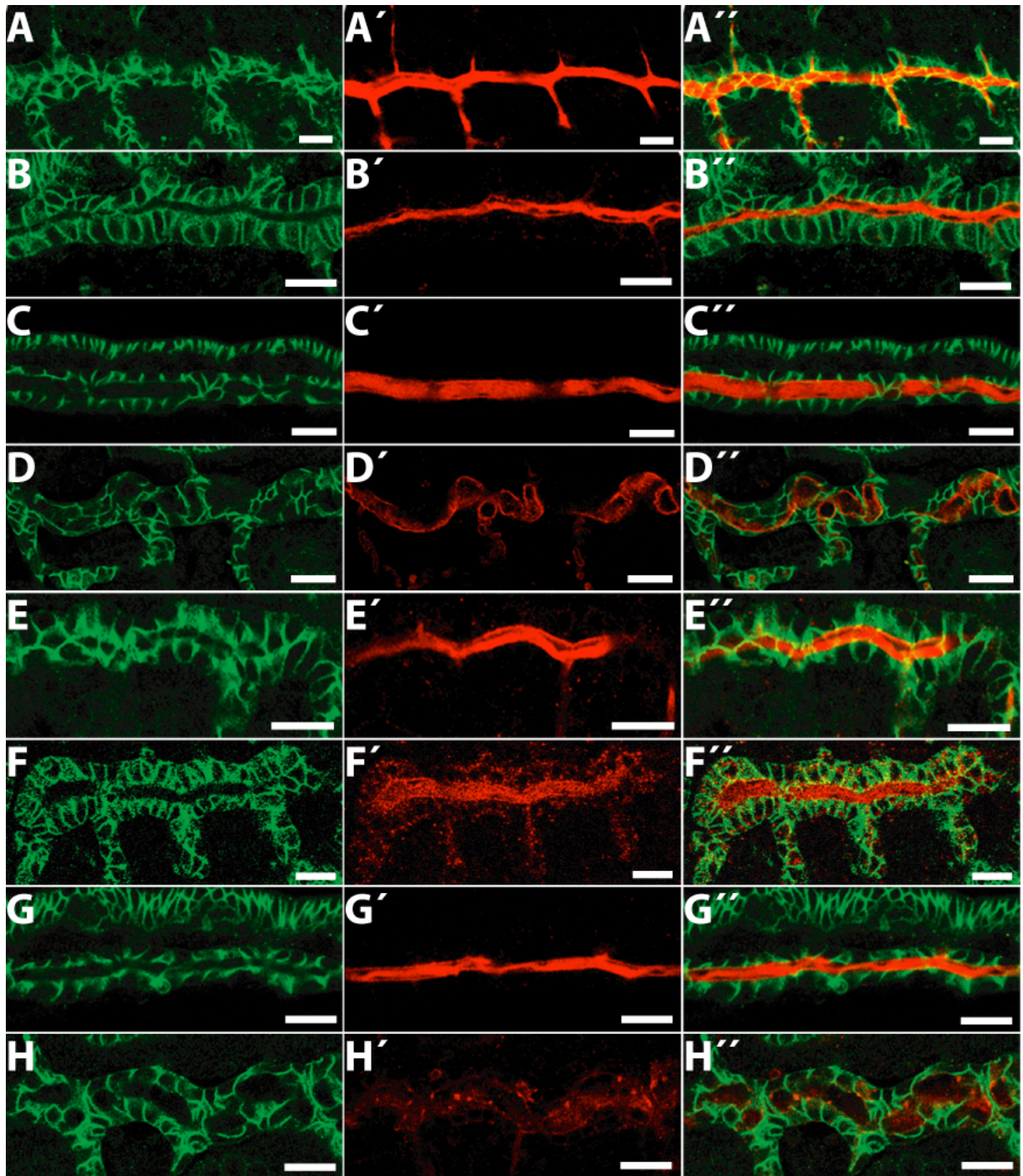
## 2.2.7 Für die Exozytose ist eine korrekte Lokalisation von Sem notwendig

Serpentine (Serp) und Vermiform (Verm) sind luminaire chitinbindende Proteine mit Polysacchariddeacetylase-Aktivität. Sie bauen die kabelähnliche extrazelluläre Matrix im Tracheensystem auf und begrenzen die Ausdehnung des Tracheensystems (Tonnin et al., 2005; Luschnig et al., 2006). *serp* bzw. *verm* mutante Embryonen verfügen über intakte *septate junctions*. Allerdings sind die *septate junctions* für die Exozytose von Serp und Verm notwendig, da in Embryonen mit defekten *septate junctions* keine normale Exozytose dieser Proteine erfolgt (Wang et al., 2006). Wie ich bereits zeigen konnte, sind die *septate junctions* in *sem* mutanten Embryonen nicht

intakt und daher interessierte ich mich für die Lokalisation von Serp und Verm in *sem* mutanten Embryonen. Dafür wurden Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbungen mit anti-Sem-Antikörpern, zur Identifizierung *sem* mutanter Embryonen, sowie mit anti-Serp- beziehungsweise anti-Verm-Antikörpern an Wildtyp- und *sem* mutanten Embryonen durchgeführt. Dabei stellte ich interessanterweise fest, dass Serp und Verm bis einschließlich des embryonalen Stadiums 15 im Lumen des Tracheensystems *sem* mutanter Embryonen konzentriert sind (siehe Abb. 2.13 B' und F'), wenngleich die Färbungen auch etwas schwächer als in Wildtyp-Embryonen des gleichen Stadiums sind (siehe Abb. 2.13 A' und E'). Allerdings ist ab dem embryonalen Stadium 16 Serp und Verm ausschließlich innerhalb der Tracheenzellen *sem* mutanter Embryonen zu finden (siehe Abb. 2.13 D' und H'), während sie in diesem Stadium in Wildtyp-Embryonen noch im Lumen des Tracheensystems lokalisiert sind (siehe Abb. 2.13 C' und G').

Bisher ist publiziert, dass Verm in *sinu* mutanten Embryonen des embryonalen Stadiums 16 nicht mehr im Lumen der Tracheen lokalisiert ist, während in Wildtyp-Embryonen Serp und Verm während des gleichen Stadiums im Tracheenlumen anzutreffen sind (Wang et al., 2006). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die *septate junctions* für die Exozytose essentiell sind. Die Beobachtung, dass sowohl Serp als auch Verm im embryonalen Stadium 15 in *sem* mutanten Embryonen noch im Lumen der Tracheen lokalisiert sind und erst ab dem Stadium 16 auf die Tracheenzellen begrenzt sind, deuten aber daraufhin, dass *sem* und wahrscheinlich auch *septate junctions* für die frühe Serp und Verm Exozytose nicht essentiell sind (siehe Diskussion).





**Abb. 2.13** Die Exozytose von Serp und Verm ist in *sem* mutanten Embryonen ab dem Stadium 16 gestört

Anti-Mega- (grün) und anti-Serp- (rot; A'-D') bzw. anti-Verm-Antikörperfärbung (rot; E'-H') an Stadium 15 (A-B und E-F) bzw. Stadium 16 (C-D und G-H) *Drosophila* Embryonen des wildtypischen (A, C, E und G) und des *sem* mutanten (*sem*<sup>G402</sup>/*sem*<sup>G402</sup>) Tracheensystems (B, D, F und H), wobei jeweils ein Ausschnitt von dem Tracheensystem gezeigt ist. Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 40x Vergrößerung, dazu kam noch

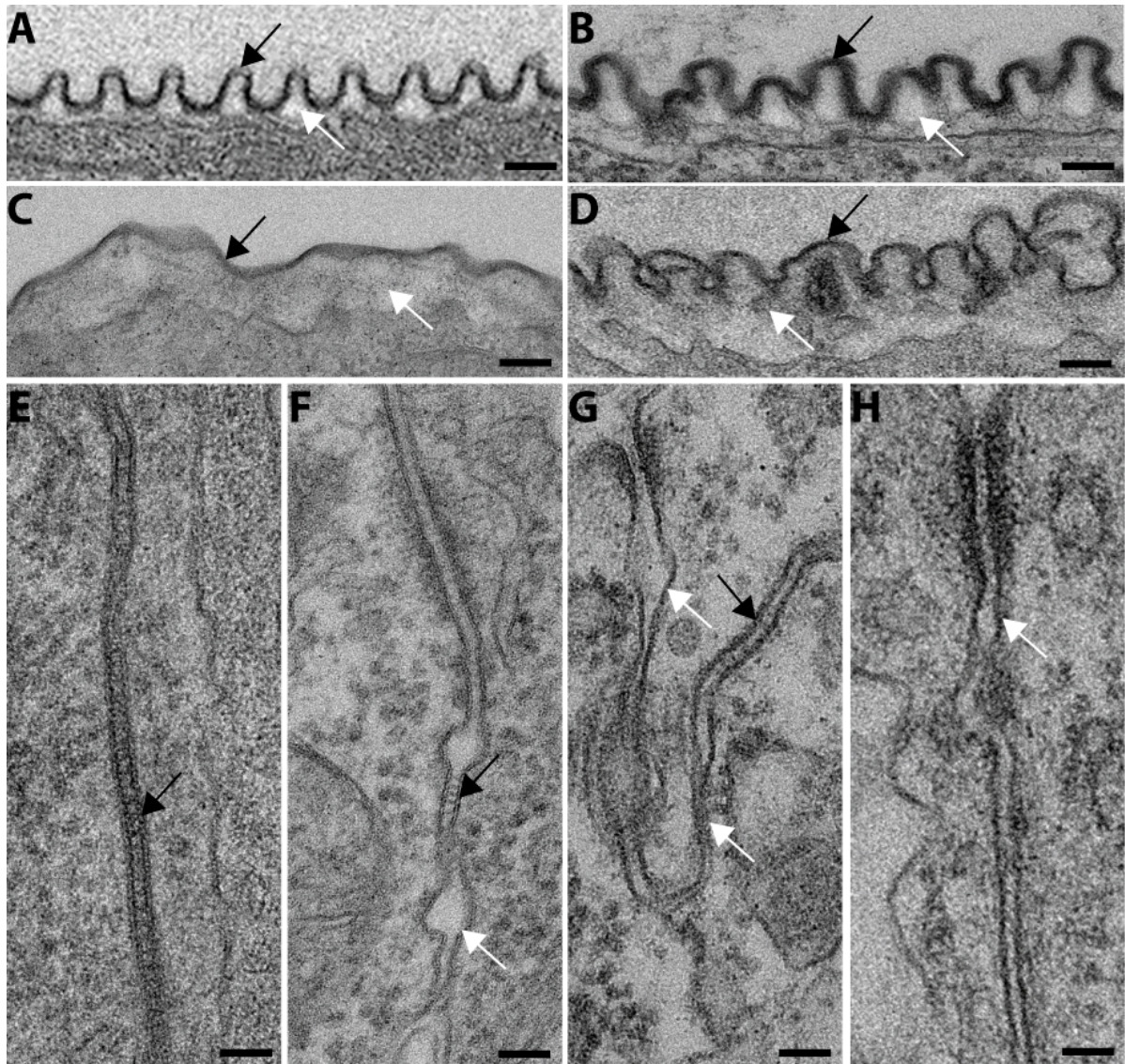
4facher Zoom. Mega ist in (A, C, E und G) Wildtyp-Embryonen sowohl im Stadium 15 (A und E) als auch im Stadium 16 (C und G) in den *septate junctions* des Tracheensystems lokalisiert während Serp (A' und C') und Verm (E' und G') im Lumen des Tracheensystems zu finden ist. In *sem* mutanten Embryonen ist Mega über die gesamte Membran der Tracheenzellen in beiden Stadien misslokalisiert (B, D, F und H) und Serp (B') bzw. Verm (F') ist im Stadium 15 im Lumen des Tracheensystems zu finden. Ab Stadium 16 ist Serp (D') und Verm (H') nicht mehr im Lumen zu finden, sondern scheinen in den Zellen des Tracheensystems angereichert zu sein. Gleiches konnte für Embryonen, die eine Defizienz tragen, die *sem* beinhaltet (*Df(2R)nap1/Df(2R)nap1*), Embryonen, die homozygoten für das zweite *sem* Allel sind (*sem<sup>B42</sup>/sem<sup>B42</sup>*), und transheterozygoten *sem* mutanten Embryonen (*Df(2R)nap1/sem<sup>B42</sup>*, *Df(2R)nap1/sem<sup>G402</sup>* und *sem<sup>B42</sup>/sem<sup>G402</sup>*) beobachtet werden (nicht gezeigt). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 20µm.

### 2.2.8 *Drosophila*-Claudine sind für den Aufbau der *septate junctions* essentiell

Nachdem ich zeigen konnte, dass in *sem* mutanten Embryonen die *septate junctions* Marker Mega (Behr et al., 2003; siehe 2.2.2) und Coracle (Fehon et al., 1994) misslokalisiert sind, interessierte ich mich für die Struktur der *septate junctions* in *sem* mutanten Embryonen. Darüber hinaus wollte ich die Struktur der *septate junctions* und der Tenidien des Tracheensystems von *mega*, *sinu* und *sem* mutanten Embryonen miteinander vergleichen. Zwar gibt es bereits von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen elektronenmikroskopische Aufnahmen (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004), aber die Erfahrungen zeigen, dass die Qualität von elektronenmikroskopischen Aufnahmen je nach angewandter Fixierungsmethode und Aufnahmetechnik stark schwanken (persönliche Kommunikation mit Dietmar Riedel). Daher habe ich mich dazu entschlossen sowohl von Wildtyp-Embryonen als auch *mega*, *sinu* oder *sem* mutanten Embryonen elektronenmikroskopische Aufnahmen unter gleichen Bedingungen anfertigen zu lassen (siehe 4.6.7), um diese dann direkt miteinander vergleichen zu können.

Bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist auffällig, dass die Tenidien in den Tracheen von Wildtyp-Embryonen regelmäßig angeordnet sind und das Bereich des weniger elektronendichten Materials etwa dem Bereich der Tenidien entspricht (siehe Abb. 2.14 A). Ebenso weisen die Septae in den Tracheen von Wildtyp-Embryonen einen gleichmäßigen Abstand zueinander auf und auch der Zwischenraum der aneinandergrenzenden Plasmamembranen ist gleich bleibend





**Abb. 2.14 Morphologische Untersuchungen der Tenidien und Septae**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen an Stadium 17 *Drosophila* Embryonen des wildtypischen (A und E), des *mega* mutanten (*mega<sup>viii</sup>/Y*; B und F), des *sinu* mutanten (*sinu<sup>nvu7</sup> / sinu<sup>nvu7</sup>*; C und G) und des *sem* mutanten Tracheensystems (*sem<sup>G402</sup>/sem<sup>G402</sup>*; D und H), wobei jeweils ein Ausschnitt des Tracheensystems gezeigt ist. Die Aufnahmen wurden an einem PhillipsCM120 BioTwin Elektronenmikroskop gemacht. Wildtyp-Embryonen weisen regelmäßige Tenidien auf (A Pfeil) und der Bereich der weniger elektronendichten Masse beschränkt sich auf den Bereich unterhalb der Tenidien (A Pfeilspitze). Weiterhin ist in Wildtyp-Embryonen der Abstand sowohl der Septae untereinander als auch der Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen zueinander gleichmäßig (E, Septae Pfeil in E). In *mega* mutanten Embryonen sind die Tenidien unregelmäßig (Pfeil B) und der weniger elektronendichte Bereich ist breiter (Pfeilspitze B), darüber hinaus gibt es deutlich weniger Septae zwischen benachbarten Zellen (Pfeil in E) und in dem Bereich wo Septae fehlen ist der Abstand zwischen den Zellen deutlich größer (Pfeilspitze in E). In *sinu* mutanten Embryonen sind tenidienartigen Ausstülpungen zu beobachten (Pfeil C) und der weniger elektronendichte Bereich

unterhalb des eigentlichen Tenidienbereiches ist breiter (Pfeilspitze C). Vereinzelt lassen sich noch Septae in *sinu* mutanten Embryonen feststellen (Pfeil in F), aber auch hier ist der Abstand zwischen den Plasmamembranen von benachbarten Zellen ungleichmäßig, so kann der Abstand größer oder kleiner sein als im Wildtyp (Pfeilspitze F). In *sem* mutanten Embryonen sind die Ausstülpungen der Tenidien ungleichmäßig (Pfeil D) und der weniger elektronendichte Bereich unterhalb der Tenidien ist verbreitert (Pfeilspitze D). Es konnten keine Septae in *sem* mutanten Embryonen gefunden werden (H) und auch hier ist der Abstand zwischen den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen teilweise vergrößert (Pfeilspitze H). Die schwarzen Balken entsprechen einer Länge von 100nm.

(siehe 2.14 E). In *mega* oder *sem* mutanten Embryonen ist keine Regelmäßigkeit der Tenidien erkennbar (siehe Abb. 2.14 B und D). In *sinu* mutanten Embryonen können keine tenidienartige Ausstülpungen des weniger elektronendichten Materials festgestellt werden (siehe Abb. 2.14 C). Des Weiteren ist der weniger elektronendichte Bereich unterhalb der Tenidien in *mega*, *sinu* oder *sem* mutanten Embryonen wesentlich größer und unregelmäßiger als in Wildtyp-Embryonen (vergleiche Abb. 2.14 B, C und D mit A). In den Tracheen von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen können vereinzelt einige wenige Septae beobachtet werden (siehe Abb. 2.14 F und G). In *sem* mutanten Embryonen gibt es keine Septae zwischen den Tracheenzellen (siehe Abb. 2.14 H). Ferner ist der Abstand zwischen den benachbarten Plasmamembranen in *mega*, *sinu* oder *sem* mutanten Embryonen in dem Bereich der fehlenden Septae unregelmäßig. An manchen Stellen sind die Membranen wesentlich weiter von einander entfernt und an anderen Stellen kommen sich sehr nah (siehe Abb. 2.14 F, G und H). Ferner gibt es Unterschiede zu den früher angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen. So konnten in vorangegangenen Untersuchungen keine Septae in *mega* mutanten Embryonen identifiziert werden (Behr et al., 2003) und in *sinu* mutanten Embryonen konnten in den vorausgegangenen Aufnahmen noch Tenidien ausgemacht werden (Wu et al., 2004). Dies bestätigt den gewählten Weg erneute Aufnahmen von allen Claudin Mutanten anzufertigen, um diese dann direkt zu vergleichen.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Mutation von *mega*, *sinu* oder *sem* unterschiedliche Auswirkungen auf das Erscheinungsbild der Tenidien und der Septae in den Tracheen haben und liefern darüber hinaus einen ersten Hinweis, dass die Funktionen der Claudine für die Bildung der *septate junctions* unterschiedlich sind.

## 2.3 Generierung und Charakterisierung spezifischer *lack of function* Mutationen von *mega*

Bislang wurden vier *mega* Allele beschrieben, bei denen es sich um zwei EMS- und zwei P-Elementintegrationsallele handelt (Beitel und Krasnow, 2000; Behr et al., 2003). Die beiden EMS-Allele, namentlich *mega*<sup>EA97</sup> und *mega*<sup>VE896</sup>, sind allerdings keine Nullmutanten. In diesen beiden Allelen kann in Embryonen *mega* mRNA detektiert werden. Embryonal letal wirkt sich die Mutation in *mega*<sup>VE896</sup> aus, die in der zweiten Transmembrandomäne des Mega Proteins einen Aminosäureaustausch aufweist. Außerdem ist das Mega Protein im Zytoplasma misslokalisiert. Der embryonale Phänotyp des Tracheensystems sowie die epitheliale Barrierefunktion von *mega*<sup>VE896</sup> sind nicht von *mega* defizienten Embryonen (*Df(1)sta;Tp(1;3)sta:ss(sta)*) zu unterscheiden. Daher handelt es sich bei *mega*<sup>VE896</sup> offensichtlich um ein stark hypomorphes oder amorphes Allel. Das EMS-Allel *mega*<sup>EA97</sup> führt zur Letalität, allerdings schlüpfen einige homozygote Embryonen als Larven und überleben bis ins dritte Larvenstadium. Es gibt zwar einen Aminosäureaustausch in der ersten extrazellulären Schleife des Mega Proteins, trotzdem ist das Protein in den *septate junctions* lokalisiert. Weiterhin sind die Tracheenäste nur schwach elongiert und bei dem Test der epithelialen Barrierefunktion war nur in 14 von 21 injizierten homozygoten *mega*<sup>EA97</sup> Embryonen Farbstoff im Tracheenlumen zu finden (Behr et al., 2003). Daher scheint es sich bei *mega*<sup>EA97</sup> um ein schwächeres hypomorphes Allel zu handeln (Behr et al., 2003). Bei den beiden P-Elementintegrationsallelen *mega*<sup>G0012</sup> und *mega*<sup>G0044</sup>, handelt es sich wahrscheinlich um stark hypomorphe oder amorphe Mutanten. Die Embryonen beider Linien sterben und sind vom Phänotyp des Tracheensystems und der epitheliale nicht von dem Phänotyp von Embryonen zu unterscheiden, die eine Defizienz tragen, die *mega* beinhaltet (*Df(1)sta;Tp(1;3)sta:ss(sta)*). Darüber hinaus lässt sich in beiden Linien weder *mega* mRNA noch Mega Protein nachweisen (Behr et al., 2003).

Allerdings sind in den oben beschriebenen vier *mega* Allelen die gesamten genomischen Bereiche des *mega* Gens vorhanden. Daher lässt es sich nicht ausschließen, dass noch *mega* mRNA transkribiert wird und möglicherweise noch funktionsfähiges Mega Protein translatiert wird. Es wäre also wünschenswert ein

*mega* Allel zu erhalten, das durch eine gezielte Deletion des *mega* Gens charakterisiert ist. Um dies zu erreichen, wandte ich die Methode des so genannten *gene replacement* durch homologe Rekombination an. Während diese Methode bei Mäusen bereits standardisiert ist (Rothstein et al., 1987), ist sie für die Erzeugung von Mutanten in *Drosophila* vergleichsweise neu, wenig erprobt und nicht oft erfolgreich durchgeführt (Rong und Golic, 2000).

Ziel war es den gesamten genomischen Bereich von *mega* gegen das *mini-white*<sup>+</sup> Gen auszutauschen, damit ausgeschlossen werden kann, dass verbleibende genomische Bereiche von *mega* transkribiert und translatiert werden können. Neben einer *lack of function* Mutante für *mega* sollte mithilfe des *gene targetings* durch homologe Rekombination zwei attB-Sites in das Genom von *Drosophila* eingefügt werden. Att-Sites können mit anderen att-Sites rekombinieren. Diese Methode beruht auf den Phagen  $\phi$ C31 (Bischof et al., 2007) und ermöglicht es synthetische Mutanten wie bei EMS-Mutagenese zu etablieren, wobei gleichzeitig das Gen an der gewünschten Stelle im Genom integriert wird und es einen geringen Kreuzungsaufwand mit sich bringt. Daher fügte ich zwei att-Sites ein, die das *mini-white*<sup>+</sup>-Gen flankieren, um veränderte *mega* Varianten in exakt dieselbe Position einfügen zu können, die dem genomischen *mega* Genort entspricht (siehe 4.4.16). Aufgrund der hohen Effizienz und dem geringen Aufwand, wäre es somit möglich sehr viele *mega* Varianten innerhalb kurzer Zeit zu analysieren und dabei Positionseffekte auszuschließen, wie es bei den herkömmlichen Methoden zur Erzeugung mutanter Fliegenlinien der Fall wäre.

### 2.3.1 *gene targeting* von *mega* durch homologe Rekombination

Für das *gene targeting* durch homologe Rekombination (Gong und Golic, 2003) wurden im ersten Schritt homozygote Weibchen, die sowohl FLP als auch I-SceI unter einem Hitzeschock Promotor exprimieren (*w,y/w,y;P{hsp70:FLP}P{hsp70:I-SceI}/CyO*), mit Männchen, die homozygot für das *mega-w*<sup>+</sup>-*mega* Konstrukt sind, gekreuzt (siehe 4.6.4). Dabei wurden drei P-Elementintegrationen vom ersten, zwei vom zweiten und eine vom dritten Chromosom verwendet. Nach 72 Stunden wurden die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Larven, die sich im zweiten bis

dritten Larvenstadium befanden, einem einstündigen Hitzeschock bei 38°C im Wasserbad ausgesetzt. Von den Nachkommen wurden ausschließlich Weibchen, die sowohl die P-Elementintegration als auch das FLP und I-SceI besitzen ( $P\{mega-w^+-mega\}/w,y;P\{hsp70:FLP\} P\{hsp70:I-SceI\}/+$ ) über die dominanten Marker ausgesucht und gesammelt. Diese Weibchen sind durch glatte Flügel ( $CyO^+$ ) gekennzeichnet. Darüber hinaus weisen sie Mosaikaugen auf (siehe Abb. 2.15 D und E), da durch die exprimierte FLP die P-Elemente und somit das *white*<sup>+</sup> Gen auch aus Augenzellgenomen desintegrieren kann und so zu nichteinheitlichen *white*<sup>+</sup> Augen führen kann. Dies zeigt an, dass durch den Hitzeschock erfolgreich I-SceI und FLP exprimiert werden. Dadurch desintegriert das P-Element aus dem Genom und liegt als extrachromosomale DNA vor (siehe Abb. 2.15 A). Die zelleigenen Reparaturmechanismen können die Enden der extrachromosomalen DNA als Doppelstrangbruch identifizieren und aufgrund der homologen Bereiche zwischen dem  $P\{mega-w^+-mega\}$ -Konstrukt und dem *mega up* bzw. dem *mega down* Bereichs im Genom (siehe Abb. 2.15 B) den genomischen *mega* Bereich gegen das *white*<sup>+</sup> Gen des Konstruktes austauschen (siehe Abb. 2.15 C). Aufgrund der Sequenzidentität der homologen Bereiche kann nicht bestimmt werden wo exakt der Austausch innerhalb der Bereiche stattfindet.

Jeweils 10 Weibchen mit Mosaikaugen, die sowohl die P-Elementintegration als auch FLP und I-SceI besitzen, und ungefähr 15 Männchen des Markerstamms  $w/Y;P\{hsp70:FLP\}10/P\{hsp70:FLP\}10$ , die FLP konstitutiv exprimieren, wurden zusammen in ein Futtergefäß gesetzt. Dabei wurden von den Weibchen, die ursprünglich eine P-Elementintegration auf dem 1. Chromosom hatten 36 Futtergefäße angesetzt, 21 Futtergefäße wurden mit Weibchen besetzt, die ursprünglich eine P-Elementintegration auf dem 2. Chromosom hatten und 10 Futtergefäße wurden mit Weibchen angesetzt, die ursprünglich eine P-Elementintegration auf dem 3. Chromosom hatten. In Abstand von je zwei Tagen wurden die Fliegen aus diesen 67 Futtergefäßen insgesamt fünf Mal in neue Futtergefäße transferiert. Aus jedem der 67 verschiedenen Kreuzungsansätze schlüpften ca. 1000 bis 2000 Nachkommen. Unter diesen Nachkommen wurde nach Weibchen mit einer einheitlichen *white*<sup>+</sup> Augenfarbe gesucht. Die konstitutive FLP, die die Nachkommen der oben beschriebenen Kreuzung tragen, kann nur P-Elemente desintegrieren, die noch FRTs besitzen. Da durch eine erfolgreiche homologe Rekombination (siehe Abb.

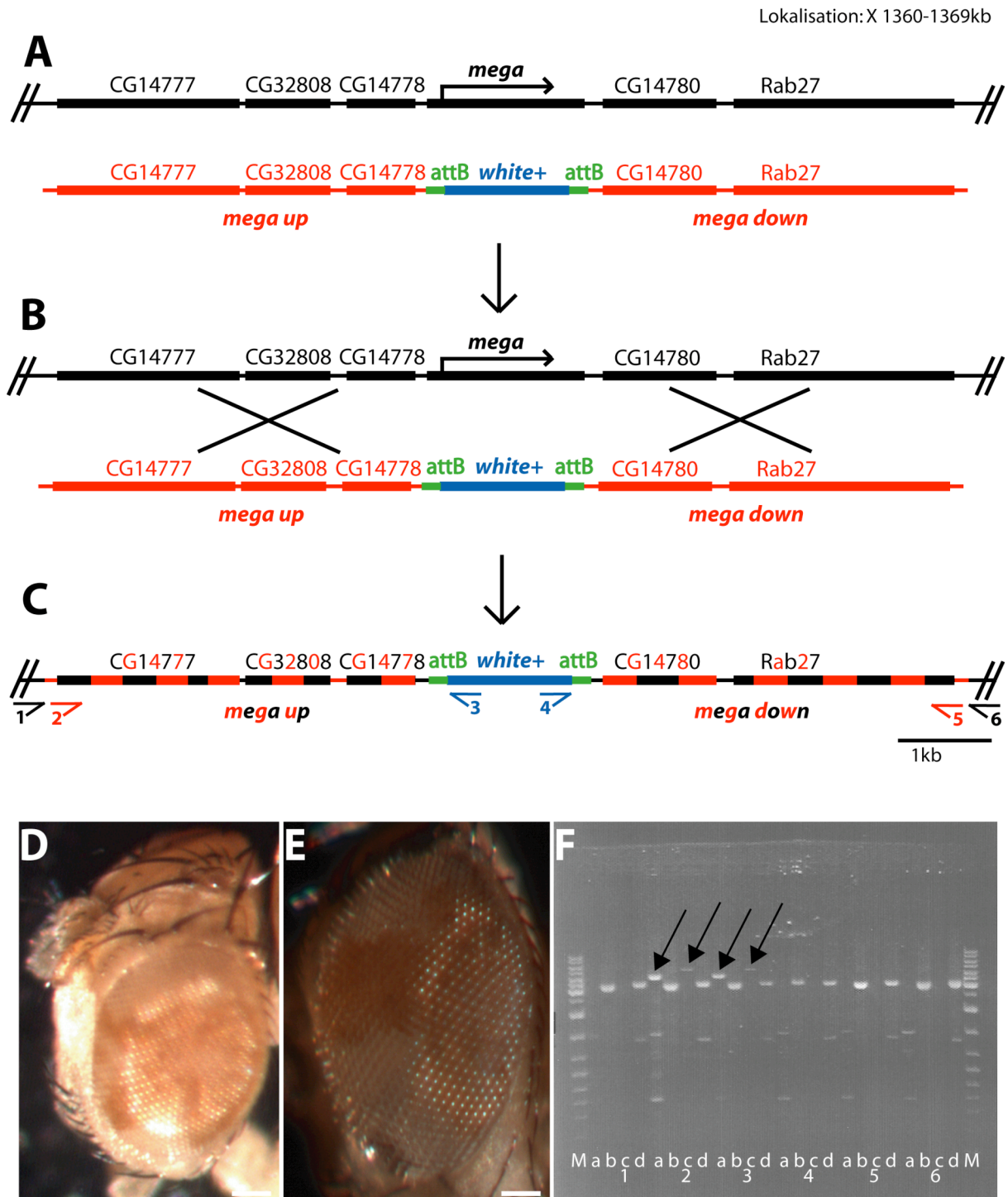


2.15 C) keine FRTs mehr vorhanden sein sollten, findet die FLP keine Erkennungssequenzen und kann das P-Element nicht mehr desintegrieren. Diese Fliegen weisen daher eine einheitliche *white*<sup>+</sup> Augenfarbe auf. Fliegen, bei denen die homologe Rekombination nicht erfolgreich war, haben noch die FRTs in ihrem Genom und werden anhand von Mosaikaugen identifiziert (siehe Abb. 2.15 D und E). Insgesamt konnten aus den 67 Röhrchen 14 Weibchen gesammelt werden, die eine einheitliche *white*<sup>+</sup> Augenfarbe haben. Diese wurden einzeln mit je fünf Männchen des Markerstamms *FM7i/Y* gekreuzt. Stocks wurden durch sammeln von *w*<sup>+</sup>, *B*<sup>-</sup> Weibchen und kreuzen mit *FM7i/Y* Männchen etabliert (*mega*<sup>I</sup> bis *mega*<sup>IX</sup>).

Von den ursprünglich 14 etablierten Stocks wurden letztendlich sechs molekular analysiert. Von den übrigen acht Stocks gab es in zwei Fällen keine Nachkommen, was auf eine Infertilität bei dem zuvor gesammeltem Weibchen hindeutet. In drei Röhrchen sind ausschließlich Fliegen mit Mosaikaugen geschlüpft. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Desintegrieren des *white*<sup>+</sup> Gens aus dem Augenzellgenom bei den eingesetzten Weibchen nicht erkannt wurde und sie daher als falsch Positive identifiziert wurden. Unter den Nachkommen aus drei unterschiedlichen Stocks waren Männchen mit roten Augen. Diese drei Stocks wurden ebenfalls aussortiert, da *mega* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, und die Mutation embryonal letal ist, sollte es bei einem erfolgreichen *gene targeting* durch homologe Rekombination diese Männchen nicht geben. Es ist davon auszugehen, dass diese drei Linien das P-Element entweder auf einem autosomalen Chromosom haben, oder der Austausch gegen *mega* auf dem X-Chromosom fehlerhaft war, da der *mega* Phänotyp am Ende des embryonalen Stadiums letal ist. Die verbliebenen sechs Linien wurden molekular analysiert, um korrekte homologe Rekombinationsereignisse zu identifizieren.

Zur molekularen Analyse dieser sechs Linien wurde genomische DNA aus heterozygoten Weibchen isoliert und mit vier Primerpaaren in der PCR analysiert (siehe 4.4.12). Zwei Primerpaare dienten dem Nachweis des erfolgreichen *gene targeting* durch homologe Rekombination, von denen sich das eine Paar 4kb *upstream* des *mega* Genortes und im 5' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens befindet und das andere Paar 4kb *downstream* des *Mega* Genortes und im 3' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens befindet. Als Kontrolle wurden PCRs mit zwei Primerpaaren durchgeführt. Bei dem ersten Kontrollprimerpaar befand sich der eine Primer im *mega up* Bereich und der andere





**Abb. 2.15 gene replacement durch homologe Rekombination für *mega***

Gezeigt ist in schwarz der genomische Bereich von *mega* und dazugehörend 4kb *upstream* sowie 4kb *downstream* des genomischen *mega* Bereichs mit den in diesem Bereich lokalisierten Genen. Dabei spiegelt der dickere schwarze Bereich den genomischen Bereich des jeweiligen Gens wieder. Diese Informationen sind nach *FlyBase* verändert. Darunter ist das *mega-w<sup>+</sup>-mega* Konstrukt abgebildet, in dem der mit dem Genom homologe Bereich rot dargestellt ist, das *white<sup>+</sup>* Gen ist blau und die *attB*-Sites, die das *white<sup>+</sup>* Gen flankieren, sind grün. Nach einer erfolgreichen Desintegration des *mega-w<sup>+</sup>*-

*mega* Konstruktes aus dem Genom, liegt dieses als extrazelluläre DNA vor (A). Zwischen den homologen Bereichen kann es zu einer homologen Rekombination kommen, angedeutet durch die Kreuze zwischen diesen Bereichen (B). Ist es zu einer erfolgreichen homologen Rekombination gekommen (C), dann ist in dem ehemaligen homologen Bereich nicht zu unterscheiden welcher Bereich ursprünglich zu dem P-Element gehörte und welcher zum Genom gehörte. Deshalb ist dieser Bereich nun rot-schwarz gestreift dargestellt. Des Weiteren ist das *white*<sup>+</sup> Gen nun zusammen mit den attB-Sites in das Genom integriert. Die eingezeichneten Primer entsprechen nicht den tatsächlichen Größenverhältnissen, sie wurden deutlich vergrößert, um sie besser darzustellen. Primer 1 (schwarz) bindet außerhalb des *mega up* Bereichs und dient zusammen mit Primer 2 (blau), der sich im 5' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens befindet, als Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination und führt in der PCR (F) zu einem 4,5kb großem PCR-Amplifikationsprodukt in Ansatz a. Als Kontrolle für diesen Bereich dient Primer 2 (rot), der sich innerhalb des *mega up* Bereichs befindet, zusammen mit Primer 3 (blau), sie führen zu einem 4kb großem PCR-Amplifikationsprodukt in Ansatz b (F). Als Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination *downstream* des ehemaligen genomischen Bereichs, wurde Primer 4 (blau) genutzt, der im 3' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens liegt und Primer 6 (schwarz), der außerhalb des *mega down* Bereichs liegt. Sie führen zu einem 4,8kb großem PCR-Amplifikationsprodukt in Ansatz c (F). Als Kontrolle für diesen Bereich wurde der blaue Primer 4, der im 3' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens liegt, und Primer 5 (rot), der sich im *mega down* Bereich befindet, verwendet, diese führen zu einem 4kb großem PCR-Amplifikationsprodukt in Ansatz d (F). Mosaikaugen wie sie nach der Deintegration des P-Elements während des *gene targetings* durch homologe Rekombination zu sehen waren (D und E). Gellauf einer PCR, um erfolgreiche *gene targeting* Ereignisse zu identifizieren (F). Dabei stehen die Zahlen für folgende Fliegenlinien: 1 = *mega*<sup>II</sup>, 2 = *mega*<sup>I</sup>, 3 = *mega*<sup>VIII</sup>, 4 = *mega*<sup>IV</sup>, 5 = *mega*<sup>V</sup>, 6 = *mega*<sup>VI</sup>. M steht für den DNA-Längenstandard. In den Reihen a ist die PCR-Nachweisreaktion mit Primer 1 (schwarz) und Primer 3 (blau), in b ist die PCR-Kontrollreaktion mit Primer 2 (rot) und Primer 3 (blau), in c ist die PCR-Nachweisreaktion mit Primer 4 (blau) und Primer 6 (schwarz) und in d ist die PCR-Nachweisreaktion mit Primer 4 (blau) und Primer 5 (rot) dargestellt (siehe auch C). Es ist deutlich erkennbar, dass die DNA-Fragmente der PCR-Reaktionen a und c nur für die Fliegenlinien *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> amplifiziert werden konnten (siehe schwarze Pfeile). Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 300µm.

Primer im 5' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens. Der eine Primer des zweiten Kontrollprimerpaares befand sich im *mega down* Bereich und der andere Primer im 3' Bereich des *white*<sup>+</sup> Gens (siehe Abb. 2.15 C). Bei allen untersuchten Linien konnten die DNA-Fragmente amplifiziert werden, die zur Kontrolle dienen (siehe Abb. 2.15 F b und d). Die PCR-Amplifikationsprodukte zum Nachweis des korrekten Integrationsorts konnten nur bei *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.15 F 2a und c sowie 3a und c). Die PCR-Amplifikationsprodukte zum Nachweis des gelungenen *gene replacements* wurden in denen TOPO-Vektor kloniert und sequenziert (siehe 4.4.13 und 4.4.14). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der benachbarten

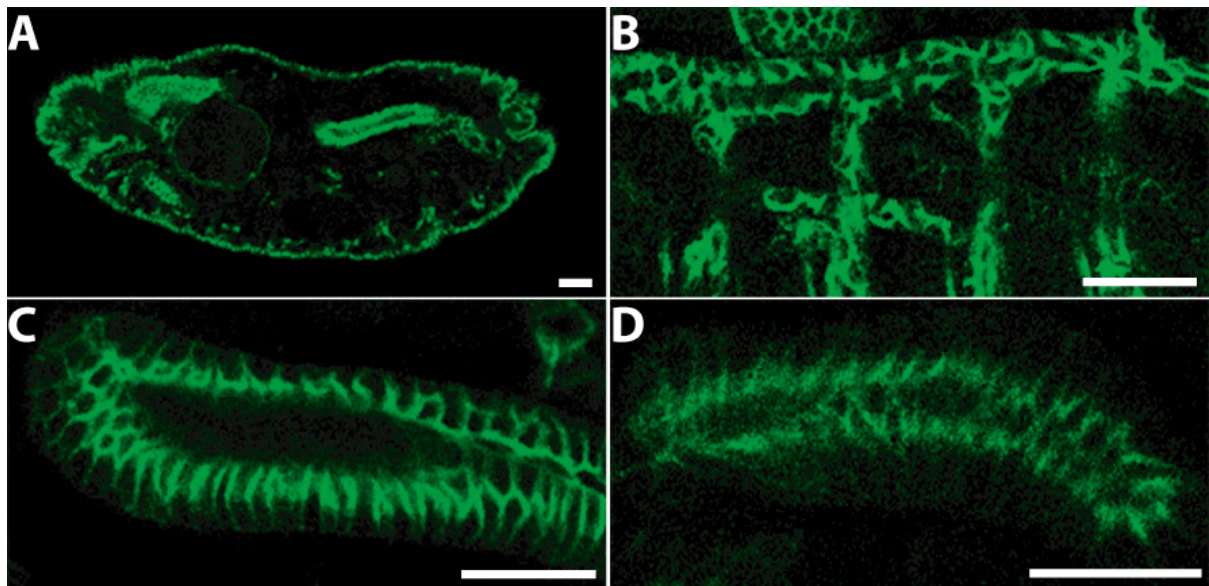
Gene nicht verändert ist und wie angenommen ein Austausch von *mega* zu *white*<sup>+</sup> stattgefunden hat. Ferner stellte sich heraus, dass die beiden *mega* Allele in den sequenzierten Bereichen identisch sind. Daher wurden die folgenden Analysen des mutanten Phänotyps nur mit Embryonen des *mega*<sup>VIII</sup> Allels durchgeführt.

*Gene targeting* durch homologe Rekombination wurde ebenfalls angewendet, um ein *sem* Allel zu erhalten, bevor die EMS-Allele aus der Arbeitsgruppe Luschnig analysiert wurden (siehe Ergebnisteil 2.2.2). Insgesamt wurden in drei unabhängigen Experimenten, wie oben für *mega* beschrieben, mehr als 150 000 Fliegen gemustert. Allerdings konnte keine *sem* Mutation molekular mittels PCR oder Testfärbungen identifiziert werden. Mögliche Gründe dafür werden am Ende der Arbeit diskutiert. Erfolgreich wurde diese Methode zur Herstellung von *kasim* Mutanten angewendet. Es konnten drei unabhängige Fliegenlinien etabliert werden, für die molekular der Austausch von *kasim* gegen das *white*<sup>+</sup> Gen nachgewiesen werden konnte. Bei Färbungen mit anti-Kasim-Antikörper ist kein Kasim-Protein detektierbar (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigte sich im Laufe dieser Arbeit, dass Kasim nicht zu der Familie der Claudine in *Drosophila* gehört (siehe 2.1), sondern lediglich ein weiteres Tetraspanin ist. Daher wurde dieses Gen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

### 2.3.2 Charakterisierung des monoklonalen anti-Mega Antikörper

Da die von M. Behr in Kaninchen hergestellten Antikörper nur begrenzt zur Verfügung stehen und aufgrund der Tatsache, dass ich viele Färbungen mit anti-Mega-Antikörper durchgeführt habe, benötigte ich mehr anti-Mega-Antikörper als zur Verfügung stand. Darüber hinaus stammen die bisherigen selbst in Auftrag gegebenen Antikörper sowie publizierte *septate junctions* Antikörper zum größten Teil aus Kaninchen und daher sind Doppelfärbungen oft nicht durchführbar. Daher gab ich einen monoklonalen anti-Mega-Antikörper aus der Maus bei GenScript Corporation in Auftrag (siehe 4.5.6), um zu erreichen, dass ich einen spezifischen Antikörper in unbegrenzten Mengen zur Verfügung habe und auch Doppelfärbungen leichter durchführen konnte.

Wir erhielten 4 Hybridomzelllinien, die im ELISA positiv für Mega getestet wurden. Die Bezeichnungen dieser Hybridomzelllinien lautete 1F7E10, 1F7F10, 1H10F4 und 1H10F7. Den Überstand dieser vier Hybridomzelllinien teste ich in einer Verdünnung von 1:5 an hitzefixierten Wildtyp-Embryonen von *Drosophila* und detektierte ein spezifisches Mega-Signal in den für Mega bekannten Geweben (Behr et al., 2003; siehe Abb. 2.16 A). Mega ist innerhalb der Zellen auf die *septate junctions* begrenzt wie für die Lokalisation in den Tracheenzellen (siehe Abb. 2.16 B), in den Hinterdarmzellen (siehe Abb. 2.16 C) und in den Speicheldrüsenzellen (siehe Abb. 2.16 D) gezeigt. Mit diesem monoklonalen anti-Maus-Antikörper habe ich alle folgenden Mega Färbungen durchgeführt.



**Abb. 2.16 Der monoklonale anti-Mega-Antikörper weist spezifisch Mega nach**

Fluoreszente anti-Mega-Antikörperfärbung (grün) an Stadium 16 hitzefixierten Wildtyp-Embryonen (A-D). Der Embryo (A) ist in lateraler Ansicht aufgenommen; dabei ist anterior links, posterior ist rechts, dorsal ist oben und ventral ist unten. Die übrigen Bilder zeigen einen Ausschnitt des Tracheensystems (B), des Hinterdarms (C) und der Speicheldrüse (D). Die Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Mikroskop gemacht, dessen Einstellungen während der Aufnahmen nicht verändert wurden. Das Okular hatte eine 10x Vergrößerung und das Objektiv eine 20x Vergrößerung, dazu kam noch 1,5facher Zoom (A), das Objektiv für die übrigen Aufnahmen (B, C und D) hatte eine 40x Vergrößerung und dazu kam noch ein 4fach Zoom. In der lateralen Gesamtaufnahme eines Wildtyp-Embryos (A) wird deutlich, dass der Maus anti-Mega-Antikörper sehr spezifisch Mega detektiert. Weiterhin weist er Mega in den *septate junctions* des Tracheensystems (B), des Hinterdarms (C) und der Speicheldrüsen (D) nach. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 20µm.

### 2.3.3 *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> sind Nullallele

Um zu zeigen, dass die Letalität von *mega*<sup>VIII</sup> durch den Verlust der *mega* Genaktivität hervorgerufen wird und kein unerwünschtes Ergebnis des *gene replacements* durch homologe Rekombination ist, habe ich einen Alleltest durchgeführt (Greenspan, 1997). Da *mega* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, kann nicht ein einfacher Alleltest angewendet werden. Deshalb habe ich einen anderen Weg gewählt, um die Linie *mega*<sup>VIII</sup> als *mega* Allel zu identifizieren. Dafür habe ich heterozygot mutante Weibchen von *mega*<sup>VIII</sup> (*mega*<sup>VIII,w/FM7i</sup>) mit Männchen gekreuzt, die homozygot für das *mega rescue* Konstrukt sind (*w/Y;P{mega rescue}/P{mega rescue}*). Kommt es zu einer Rettung, so würde man erwarten, dass etwa die Hälfte der Männchen unter den Nachkommen dieser Kreuzung rote Bar<sup>+</sup> Augen haben (*mega*<sup>VIII,w/Y;P{mega rescue}/+). Ein Auszählen der Nachkommen nach ihrem Phänotyp ergab 47 Männchen mit roten Bar<sup>+</sup> Augen und 53 Männchen mit weißen Bar<sup>-</sup> Augen. Das entspricht den Erwartungen für eine erfolgreiche Rettung des *mega* mutanten Phänotyps. Dies macht deutlich, dass das *mega rescue* Konstrukt den nicht lebensfähigen Phänotyp von *mega*<sup>VIII</sup> zur vollständigen Lebensfähigkeit retten kann, und zeigt eindeutig, dass die Letalität von *mega*<sup>VIII</sup> durch den Verlust von *mega* hervorgerufen wird.</sup>

Wie Antikörperfärbungen mit anti-Mega-Antikörper an hitzefixierten *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen verdeutlichen, lässt sich kein Mega Protein nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies offenbart, dass es sich bei *mega*<sup>VIII</sup>, um ein *mega* Allel handelt, in dem kein Mega Protein mehr nachgewiesen werden kann.

Um zu überprüfen, ob es sich bei *mega*<sup>VIII</sup> um einen amorphen Phänotyp handelt, der möglicherweise von den beschriebenen Phänotypen der bisher bekannten *mega* Allelen abweicht, führte ich zunächst eine Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbung von anti-Mega- und anti-Sem-Antikörper an hitzefixierten Embryonen von *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen und Wildtyp-Embryonen durch. Dabei identifizierte ich *mega* mutante Embryonen durch eine fehlende Mega-Färbung, wenn diese Embryonen gleichzeitig eine Sem-Färbung aufweisen. Bei ca. einem Viertel der Embryonen war dies der Fall und in diesen war Sem verglichen mit Wildtyp-Embryonen in den Zellen des Tracheensystems (vergleiche Abb. 2.17 B mit A), des Hinterdarms (vergleiche Abb.

2.17 B' mit A') und der Speicheldrüsen (vergleiche Abb. 2.17 B'' mit A'') stark misslokalisiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass Sem in *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen misslokalisiert ist und nicht mehr auf die *septate junctions* beschränkt ist. Dies deutet daraufhin, dass die *septate junctions* möglicherweise nicht mehr korrekt ausgebildet werden.

Bei einer weiteren Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbung mit anti-Mega-Antikörper und dem als *septate junctions* Marker beschriebenen anti-Coracle-Antikörper (Fehon et al., 1994) an hitzefixierten *mega*<sup>VIII</sup> und Wildtyp-Embryonen, wurden hemizygot *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen anhand einer nicht erfolgten Mega-Färbung aber einer erfolgreichen Coracle-Färbung identifiziert. Bei diesen Embryonen war eine Misslokalisierung von Coracle in den Zellen des Tracheensystems, des Hinterdarms und der Speicheldrüsen verglichen mit den Wildtyp-Embryonen zu beobachten (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies zeigt, dass Coracle in *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen nicht mehr aus die *septate junctions* begrenzt ist und unterstützt gleichzeitig die Annahme, dass die *septate junction* in *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen nicht intakt sind.

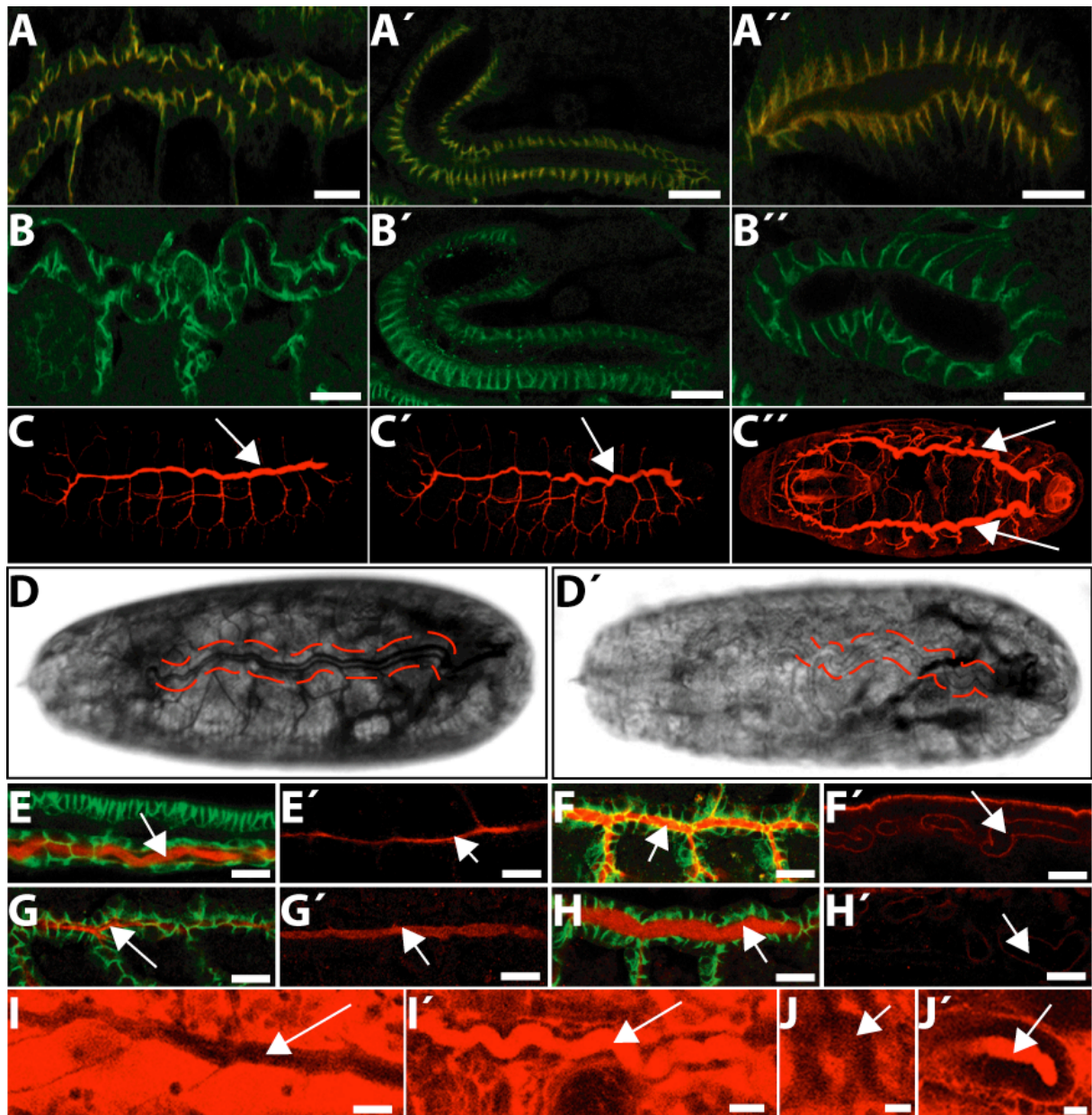
Zur Überprüfung des Phänotyps der Tracheen von *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen, wurden diese sowie Wildtyp-Embryonen hitzefixiert und mit *cbp* angefärbt (siehe 4.5.5). Bei den Embryonen der Linie *mega*<sup>VIII</sup> war verglichen mit den Wildtyp-Embryonen ein deutlich elongiertes Tracheensystem zu beobachten (vergleiche Abb. 2.17 C' und C'' mit C).

Der Vorgang des *liquid clearance*, bei dem die Flüssigkeit im Lumen des Tracheensystems gegen Gas ausgetauscht wird (Manning und Krasnow, 1993), findet in Wildtyp-Embryonen im Stadium 17 statt. Allerdings kommt es zu keiner *liquid clearance* des Tracheensystems, wenn es eine Unterdrückung der Genfunktion von *mega*, *sinu* oder *sem* im Tracheensystem gibt (siehe 2.1.2.3 und Abb. 2.4 C, D und E) oder in *sem* mutanten Embryonen (siehe 2.2.5 und Abb. 2.11 C bis I). Daher interessierte ich mich für den *liquid clearance* Vorgang in *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen. In *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen kommt es zu keinem *liquid clearance* verglichen mit den Wildtyp-Embryonen (vergleiche Abb. 2.17 D' und D'' mit D), bevor sie gegen Ende der Embryogenese sterben.

Serp und Verm sind Chitin-Deacetylasen, die für den korrekten Aufbau des Chitinfilaments im Lumen des Tracheensystems von *Drosophila* Embryonen essentiell sind (Tonning et al., 2005), sie deacetylieren Chitin zu Chitosan (Luschnig et al., 2006). In *serp* und *verm* mutanten Embryonen sind die *septate junctions* intakt, allerdings ist die Exozytose von Serp und Verm in das Lumen des Tracheensystems in *sinu* mutanten Embryonen beeinträchtigt (Wang et al., 2006). Ausgehend davon interessierte ich mich für die Exozytose von Serp und Verm in *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen. Daher führte ich Antikörper-Fluoreszenz-Doppelfärbungen an hitzefixierten *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen mit anti-Mega- und anti-Serp- bzw. anti-Verm-Antikörpern durch. Dabei wurden bei beiden Färbungen die *mega* mutanten Embryonen durch eine nicht erfolgte Anfärbung mit Mega identifiziert, wenn dieser Embryo gleichzeitig mit Serp bzw. Verm angefärbt war. Serp und Verm waren bis einschließlich Stadium 15 ausschließlich im Tracheenlumen lokalisiert, sowohl bei Wildtyp-Embryonen als auch bei *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (siehe Abb. 2.17 E, E', G und G'). Bei *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen des Stadiums 16 war Serp bzw. Verm nicht mehr im Tracheenlumen sondern im apikalen Bereich der Tracheenzellen lokalisiert, wohingegen in Wildtyp-Embryonen Serp bzw. Verm im Lumen des Tracheensystems lokalisiert war (vergleiche Abb. 2.17 F mit F' und H mit H'). Dies weist auf eine beeinträchtigt Exozytose der Chitin modifizierenden Proteine Serp und Verm in *mega<sup>VIII</sup>* mutanten Embryonen hin.

Um den parazellulären Fluss und somit die Barrierefunktion der *septate junctions* in lebenden *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen zu überprüfen, wurde in den posterioren Pol von Embryonen einer heterozygoten *mega<sup>VIII</sup>* Ablage TexasRed-Dextran-10kDa injiziert (siehe 4.6.7). Dabei wurden hemizygote *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen am konfokalen Mikroskop anhand des für *mega* mutanten Embryonen charakteristischen elongierten Tracheensystems identifiziert. Innerhalb weniger Minuten breitet sich der Farbstoff im Körper des Embryos aus. Allerdings kann er nicht die transepitheliale Barriere internalisierter Epithelien wie des Tracheensystems und der Speicheldrüsen passieren. Ein Defekt der transepithelialen Barriere führt dazu, dass der Farbstoff durch den parazellulären Transport in das Lumen des Tracheensystems oder der Speicheldrüsen gelangt. Dies war bereits nach wenigen Minuten bei *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen der Fall, während bei Wildtyp-Embryonen nach einer Stunde noch kein Farbstoff im Tracheen- (vergleiche Abb. 2.17 I' mit I) oder Speicheldrüsenlumen





**Abb. 2.17 Phänotypische Analyse des *mega*<sup>VIII</sup> Allels**

In dieser Abbildung ist der Phänotyp von Wildtyp- und *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen für die Lokalisation von *septate junctions*-Markern (A und B), dem Phänotyp des Tracheensystems (C), *liquid clearance* der Tracheen (D), Exozytose (E bis H) und die Barrierefunktion (I und J) zusammengefasst. Fluoreszente Aufnahmen von anti-Mega- (rot) und anti-Sem-Antikörpern (grün) von Stadium 16 Wildtyp- (A) und *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen (B) für das Tracheensystem (A und B), den Hinterdarm (A' und B') und die Speicheldrüsen (A'' und B''). Dabei kann in Wildtyp-Embryonen eine Überlagerung von Mega und Sem in dem Bereich der *septate junctions* in den Zellen des Tracheensystems (A), des Hinterdarms (A') und der Speicheldrüsen (A'') beobachtet werden. In *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen ist Mega nicht zu detektieren und Sem ist über die laterale Membran in den Zellen des Tracheensystems (B), des Hinterdarms (B') und der Speicheldrüsen (B'') misslokalisiert. Im Vergleich zu dem Phänotyp des Tracheensystems von Stadium 16 Wildtyp-Embryonen (C), ist das Tracheensystem von *mega*<sup>VIII</sup> Embryonen stark elongiert



(C' laterale Ansicht, C'' dorsale Ansicht). Während Wildtyp-Embryonen (D) ein *liquid clearance* in Stadium 17 durchführen, findet in *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen kein *liquid clearance* statt (D' laterale Ansicht, D'' dorsale Ansicht). Die rotgestrichelten Linien machen die Lage des dorsalen Hauptstamms kenntlich, sofern dieser in der Betrachtungsebene liegt (D bis D'). Ferner sterben *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen am Ende der Embryogenese. Fluoreszenz anti-Serp- (rot) und anti-Mega-Antikörperfärbung (grün) an Stadium 15 (E und E') und Stadium 16 (F und F') Wildtyp- (E und F) und *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (E' und F'). Mega ist in *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (E' und F') nicht detektierbar. Serp ist in Stadium 15 *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (E') wie in Wildtyp-Embryonen (E) im Tracheenlumen lokalisiert. Allerdings ist Serp in Stadium 16 *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (F') im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (F) stark misslokalisiert und scheint im Lumen der Tracheenzellen angereichert zu sein. Gleiches wie für Serp ist für die anti-Verm- (rot) und anti-Mega-Antikörperfärbung (grün) zu beobachten (G und H). Hier ist Verm in Stadium 15 *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (G') wie in Wildtyp-Embryonen (G) im Tracheenlumen lokalisiert aber ab Stadium 16 ist Verm in *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (H') verglichen mit Wildtyp-Embryonen (H) stark misslokalisiert und scheint wie Serp im Lumen der Tracheenzellen angereichert zu sein. Wird Texas-Red®-Dextran-10kDa in den posterioren Pol von Stadium 16 Wildtyp- (I und J) und *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (I' und J') injiziert, so ist in Wildtyp-Embryonen kein Farbstoff im Tracheen- (I) oder Speicheldrüsenlumen (J) zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bereits 10 min nach der Injektion der Farbstoff im Lumen des Tracheensystems (I') und der Speicheldrüsen von *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen (J') detektierbar. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 20µm.

(vergleiche Abb. 2.17 J' mit J) erkennbar war. Dies zeigt, dass die Barrierefunktion der *septate junctions* in *mega<sup>VIII</sup>* Embryonen beeinträchtigt ist, da durch den parazellulären Fluss Farbstoff in das Lumen der Tracheen und der Speicheldrüsen einströmen kann.

Alle diese Indizien bestätigen, dass es sich bei *mega<sup>VIII</sup>* um ein amorphes *mega* Allel handelt. Ein Unterschied, wie beispielsweise eine Verstärkung des Phänotyps, zu den bereits beschriebenen *mega* Allelen konnte nicht beobachtet werden.

### 3 Diskussion

Epithelien ermöglichen es vielzelligen Organismen unterschiedliche Kompartimente zu etablieren. Um solch eine Unterteilung zu ermöglichen, muss der Austausch von Stoffen zwischen den einzelnen Kompartimenten und dem restlichen Körper kontrolliert werden. Dazu zählt auch die Kontrolle über den parazellulären Fluss. In Vertebraten übernehmen die *tight junctions*, die in jedem Epithel zu finden sind, die Kontrolle des parazellulären Flusses. *Tight junctions* bauen zu diesem Zweck eine Barriere zwischen den benachbarten Epithelzellen auf. Genauer gesagt wird diese Barriere, die den parazellulären Fluss kontrolliert, von Transmembranproteinen aufgebaut, die zur Familie der Claudine gehören. Claudine sind in den *tight junctions* lokalisiert und bestimmen die Selektivität der transepithelialen Barriere.

In ihrer Struktur sind Claudine hoch konserviert. So verfügen alle Claudine über intrazelluläre Termini, zwei extrazelluläre Schleifen sowie eine intrazelluläre Schleife (Turksen und Troy, 2004). So konnten mittlerweile insgesamt 24 Vertebraten-claudine charakterisiert werden, die sich in ihrem Expressionsmuster stark unterscheiden und es somit ermöglichen eine Vielzahl von unterschiedlichen Kompartimenten im Körper aufzubauen (Lal-Nag und Morin, 2009). Seit der Entdeckung, dass Claudine als Bestandteil der *tight junctions* die Permeabilitätsbarrieren von Epithelien bilden (Furuse et al., 1998), gilt der Erforschung der Claudine ein enormes Interesse, zumal es eine Vielzahl von Erkrankungen gibt, die auf veränderte Claudine zurückzuführen sind (Sawada et al., 2003; Ben-Yosef et al., 2003; Miyamoto et al., 2005). Dennoch wurden bisherige Funktionsanalysen von Claudinen ausschließlich mittels Zellkultur durchgeführt (Nitta et al., 2003). In *Drosophila* wird die Barrierefunktion von den *septate junctions* vermittelt, die analog zu den *tight junctions* sind (Furuse und Tsukita, 2006).

Lange Zeit war unklar, ob Claudine in Invertebraten existieren, da *tight junctions* in Vertebraten und *septate junctions* in Invertebraten unterschiedlich aufgebaut sind (Furuse und Tsukita, 2006). So sind in Vertebraten die *tight junctions* apikal gelegen und die *adherens junctions* schließen sich basal an, während in *Drosophila* die *adherens junctions* apikal liegen gefolgt von den basal liegenden *septate junctions* (Knust und

Bossinger, 2002; Tepass et al., 2003). Dann wurden 2003 vier Claudin-ähnliche Proteine in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) mittels Blast-Suche identifiziert (Asano et al., 2003). Kurz darauf wurde Megatrachea (Mega) als erstes Claudin in *Drosophila* charakterisiert (Behr et al., 2003), gefolgt von der Beschreibung des *Drosophila*-Claudins Sinuous (Sinu; Wu et al., 2004). Mithilfe erster *in silico* Analysen in *Drosophila* konnten fünf weitere potentielle Claudine identifiziert werden (Gerlach, N., Dissertation Braunschweig 2006).

*Drosophila* verfügt somit, verglichen mit Vertebraten, über eine überschaubare Anzahl von Claudinen und ist darüber hinaus leicht zu manipulieren. Daher bietet sich *Drosophila* als Modellorganismus zur Erforschung der Claudine *in vivo* an. Deshalb könnte *Drosophila* dazu beitragen, die Funktion der Claudine näher zu bestimmen.

Die bereits erwähnten potentiellen Claudine in *Drosophila* wurden Sesam (Sem; CG1298), Kasim (CG12026), Milan (CG3770), Ali baba (CG6982) und Hot dog (CG6398) genannt (Gerlach, N., Dissertation Braunschweig 2006). Um eine Eingrenzung der potentiellen Claudine in *Drosophila* vorzunehmen, nutzte ich im Rahmen dieser Arbeit die Methode der RNA *interference* (kurz: RNAi; Fire et al., 1998), wobei mithilfe RNAi-vermittelter gewebespezifischer Unterdrückung der Genexpression der potentiellen Claudine eine artifizielle *lack of function* Situation erzeugt wurde. Die Phänotypen von Embryonen, in denen RNAi-vermittelt gewebespezifisch *sem*, *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* unterdrückt wurden, wurden mit den nachfolgend aufgezählten Phänotypen verglichen, die sowohl für *mega* als auch für *sinu* mutante Embryonen beschrieben sind (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004).

Mega und Sinu werden in ektodermalen Geweben exprimiert und sind auf die *septate junctions* begrenzt. Dabei sind die *septate junctions* die analogen Strukturen zu den *tight junctions*, in denen die Vertebratenclaudine lokalisiert sind. Ferner verfügen sowohl die Vertebratenclaudine als auch Mega und Sinu über das nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren genannte W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004), das als ein Charakteristikum für Claudine angesehen wird (Turksen und Troy, 2004; Van Itallie und Anderson, 2005). Mutationen in Mega oder Sinu führen zur Letalität, und Komponenten der *septate junctions* sind nicht länger auf den Bereich der *septate*

*junctions* begrenzt (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004). Der Prozess des *liquid clearance*, bei dem im Stadium 16 die bis dahin mit Flüssigkeit gefüllten Tracheen mit Gas gefüllt werden (Furuse und Tsukita, 2006), findet nicht statt, wenn die *septate junctions* beeinträchtigt sind (persönliche Kommunikation mit Martin Jaspers).

Anhand der zuvor beschriebenen Kriterien von Claudinen in *Drosophila* und ausgehend davon, dass Claudine auf die *septate junctions* begrenzt sind und sich so verhalten wie die bereits bekannten *Drosophila*-Claudine, kam ich zu dem Schluss, dass es sich bei den potentiellen Claudinen Kasim, Milan, Ali baba und Hot dog nicht um Claudine handeln kann. Es werden alle potentiellen Claudine wie *mega* und *sinu* in ektodermalen Geweben exprimiert (siehe 2.1.3). Und Kasim weist darüber hinaus das vollständige W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife auf (siehe 2.1.1), während Milan, Ali baba und Hot dog nur über Teile des W-GLW-C-C-Motifs verfügen (siehe 2.1.1). Aber es gibt zwischen den bisher beschriebenen *Drosophila*-Claudinen Mega und Sinu und den potentiellen Claudinen Kasim, Milan, Ali baba und Hot dog keine weiteren Gemeinsamkeiten. Die RNAi-vermittelte Unterdrückung von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem ist nicht letal im Gegensatz zu der beobachteten Letalität zum Ende des ersten Larvenstadiums von *mega*, *sinu* oder *sem* (siehe 2.1.2.1). Des Weiteren hat die RNAi-vermittelte Unterdrückung von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* in den Tracheenzellen keinen Einfluss auf die Morphologie des Tracheensystems, während bei *mega*, *sinu* oder *sem* die Tracheen elongiert sind (siehe 2.1.2.2). Ebenso findet trotz RNAi-vermittelter Unterdrückung von *kasim*, *milan*, *ali baba* oder *hot dog* im Tracheensystem eine *liquid clearance* statt, während es zu keiner *liquid clearance* von *mega*, *sinu* oder *sem* kommt (siehe 2.1.2.3). Auch wenn Kasim, Ali baba oder Hot dog in den Zellen des Tracheensystems nach RNAi-vermittelter Unterdrückung im Tracheensystem nicht mehr nachgewiesen werden können, so ist der *septate junctions* Marker Coracle (Fehon et al., 1994) weiterhin auf die *septate junctions* begrenzt, wohingegen es bei *mega*, *sinu* oder *sem* zu einer Verteilung des *septate junctions* Marker Coracle über die gesamte laterale Membran kommt (siehe 2.1.2.4). Da die grundlegenden Überlegungen davon ausgehen, dass *Drosophila*-Claudine in den *septate junctions* lokalisiert sind und sich alle ähnlich verhalten, ist lediglich Sem als mögliches weiteres Claudin anzusehen, zumal Sem ebenfalls über das W-GLW-C-C-Motif in der ersten extrazellulären Schleife verfügt und eine sehr hohe

Sequenzidentität mit Mega und Sinu in dem Bereich der ersten extrazellulären Schleife aufweist (siehe 2.1.1).

Mittlerweile konnten weitere Indizien gesammelt werden, die Kasim, Ali baba und Hot dog als *Drosophila*-Claudine ausschließen. So wurde mit Thms in Maus und Mensch ein Analog von Kasim in Vertebraten identifiziert, das in mutierter Form zu Taubheit führt und nicht zur Familie der Claudine zählt (Shabbir et al., 2006 und Longo-Guess et al., 2007). Ali baba hat mit VAB-9 ein Analog in *C. elegans* (Gerlach, N. Dissertation, Braunschweig 2006). VAB-9 ist eine Komponente der so genannten *C. elegans apical junction*. So wird die einzige *junction* in *C. elegans* bezeichnet, da es hier weder *tight junctions* noch *adherens junctions* gibt (Knust und Bossinger, 2002; Tepass et al., 2003). VAB-9 interagiert mit dem Cadherin-Catenin-Komplex und stabilisiert diesen. Ferner reguliert VAB-9 Interaktionen zwischen dem Zytoskelett und dem *adherens junctions* Bereich der *C. elegans apical junction* (Simske et al., 2003). Bei Hot dog könnte es sich um eine  $\gamma$ -Untereinheit des Calcium-Kanals handeln (Harder, B. Dissertation, Braunschweig 2009). Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten können spezifisch an Synapsen lokalisiert sein, aber auch in anderen Geweben vorkommen (Black, 2003).

Um im Rahmen dieser Arbeit nachzuweisen, dass es sich bei Sem um ein Claudin handelt, war die Analyse von *sem* mutanten Embryonen notwendig. Dies Vorhaben gestaltete sich äußerst schwierig, da es für den *sem* Genort keine P-Elementinsertionslinie gibt, weshalb mit Hilfe des *gene replacements* durch homologe Rekombination versucht wurde einen Austausch von *sem* gegen das *mini-white<sup>+</sup>*-Gen durchzuführen (Gong und Golic, 2003). Diese Methode ist zwar bisher wenig in *Drosophila* erprobt, stellte aber die einzige Möglichkeit dar eine definierte *lack-of-function* Mutante für *sem* zu generieren. Dafür wurden in drei unabhängigen Versuchen mehr als 150.000 Fliegen durchgemustert. Dies blieb allerdings ohne Erfolg. Es ist davon auszugehen, dass das *gene replacement* durch homologe Rekombination nur für Gene möglich ist, die weiter von dem Centromer entfernt sind als *sem*. Es wurde bereits diskutiert, dass das *gene targeting* durch homologe Rekombination besonders gut funktioniert, wenn das auszutauschende Gen nah an den Telomeren liegt (Engels, 2000). Eine weitere Möglichkeit ist, dass dieser DNA-Abschnitt dicht gepackt vorliegt und daher schlecht zugänglich ist, da in diesem Bereich auch keine P-Elemente integriert sind. Für P-Elemente ist bekannt, dass sie

hauptsächlich und bevorzugt in offene, weniger dicht gepackte Chromatinbereiche integrieren (Peter et al., 2002). Durch eine Kooperation mit Stefan Luschning konnten aus einer Mutantenkollektion, die durch das mutagene Agens Ethylmethansulfonat (EMS) etabliert wurde, zwei *sem* Allele identifiziert werden (siehe 2.2.2). Dabei weist das Allel *sem*<sup>B42</sup> einen Aminosäureaustausch von P zu G in Position 41 in der ersten extrazellulären Schleife sowie einen weiteren im N-Terminus von E zu G in der Position 191 auf (siehe 2.2.2). Das andere Allel *sem*<sup>G402</sup> weist einen Aminosäureaustausch in der Position 47 von G zu D auf (siehe 2.2.2). In beiden Mutanten kann Sem weiterhin nachgewiesen werden, wenn auch deutlich schwächer als in Wildtyp Embryonen und stark misslokalisiert (siehe 2.2.2).

In dem *sem*<sup>G402</sup> Allel ist das G des W-GLW-C-C-Motifs in ein D ausgetauscht (siehe 2.2.2). Dieses Motif ist sowohl in Vertebraten als auch in Invertebratenclaudinen zu finden. Allerdings wird über seine Funktion bis dato nur spekuliert. So wird angenommen, dass die Cysteine eine Disulfidbrückenbindung ausbilden und dies zur Proteinstabilität beiträgt. Dabei wird diskutiert, ob diese Disulfidbrückenbindung zwischen den Cysteinen des W-GLW-C-C-Motifs eines Claudins ausgebildet wird, oder die Cysteine zweier Claudine von benachbarten Zellen diese Verbindung eingehen (Angelow et al., 2008). Aufgrund der Konservierung dieses W-GLW-C-C-Motifs von Invertebraten bis hin zu Vertebraten ist davon auszugehen, dass dieses Motif für die Funktion von Claudinen von entscheidender Bedeutung ist. Würde man gezielte Punktmutationen in einem Claudin setzen wollen, um die Funktion von Claudinen *in vivo* besser zu verstehen, so wäre das W-GLW-C-C-Motif dafür ideal. Mit dem *sem*<sup>G402</sup> Allel haben wir also eine sehr interessante Claudinmutante in der Hand. Da diese Mutation letal ist, unterstreicht sie die Bedeutung des Motifs *in vivo* (siehe 2.2.5). Sem ist in Embryonen, die homozygot für das *sem*<sup>G402</sup> Allel sind, nicht länger in den *septate junctions* angereichert, sondern diffus in der gesamten Zelle mit Ausnahme des Zellkerns verteilt (siehe 2.2.2 und 2.2.3). Daher kann vermutet werden, dass das G des W-GLW-C-C-Motifs für den Transport oder die stabile Lokalisation von Sem in den *septate junctions* essentiell ist. In Embryonen, die homozygot für das *sem*<sup>B42</sup> Allel sind, ist ebenfalls eine diffuse Verteilung von Sem über die gesamte Zelle mit Ausnahme des Zellkerns zu beobachten (siehe 2.2.2 und 2.2.3). Allerdings konnte in diesem Allel der Austausch von zwei Aminosäuren identifiziert werden (siehe 2.2.2) und daher ist

es nicht möglich zu sagen ob der Austausch von einer Aminosäure oder von beiden Aminosäuren zu diesem Effekt führt.

Von *mega* sind ebenfalls zwei EMS-Allele beschrieben. Bei *mega*<sup>EA97</sup> bewirkt ein Nukleotidaustausch einen Aminosäurenaustausch von E zu V im Protein an der Position 97, während bei *mega*<sup>VE896</sup> ein Nukleotidaustausch zum Aminosäureaustausch von V zu M an der Position 113 führt. Bei diesen beiden EMS induzierten Mutantenlinien handelt es sich, wie bei den EMS Allelen von *sem*, um hypomorphe Allele, die auch embryonal letal sind und darüber hinaus ist Mega ebenfalls in den EMS induzierten *mega* mutanten Embryonen nicht in den *septate junctions* angereichert, sondern im Zytoplasma misslokalisiert (Behr et al., 2003). Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen für EMS induzierte *sem* mutante Embryonen und unterstreicht die jeweilige Bedeutung der ausgetauschten Aminosäure.

In *sem* mutanten Embryonen beider Allele sind die *septate junctions* Marker Mega, Sinu, Coracle und FasciclinIII über die gesamte laterale Membran in Zellen der Tracheen, des Hinterdarms, der Speicheldrüse und der Epidermis misslokalisiert (siehe 2.2.2 und 2.2.3 sowie eigene Beobachtungen). Der dorsale Hauptstamm und die davon abzweigenden Äste in den Linien *sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup> zeigen den gleichen elongierten Phänotyp (siehe 2.2.4), wie er für *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen beschrieben ist (Beitel und Krasnow 2000). Die Regulation des parazellulären Flusses ist in *sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup> Embryonen beeinträchtigt und ermöglicht bereits 10min nach der Injektion von Texas-Red®-Dextran mit einer molekularen Masse von 10kDa das Einströmen des Farbstoffs in das Lumen des Tracheensystems und der Speicheldrüsen (siehe 2.2.6). Auch dies ist bereits für *mega* oder *sinu* mutante Embryonen beschrieben (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004). Ferner konnte keine Füllung des Tracheensystems mit Gas, genannt *liquid clearance*, bei *sem*<sup>B42</sup> und *sem*<sup>G402</sup> Embryonen beobachtet werden und die Mutationen wirken sich zum Ende der Embryogenese letal aus (siehe 2.2.5). Es kommt zu keiner *liquid clearance* wenn die *septate junctions* beeinträchtigt sind (eigene Beobachtungen und persönliche Kommunikation mit Martin Jaspers). Allerdings ist bislang über den genauen Ablauf des *liquid clearance* wenig bekannt und daher kann noch keine Vermutung über die Rolle der *septate junctions* bei diesem Vorgang geäußert werden.

Serp und Verm sind Chitin-Deacetylasen und für die richtige Ausbildung des Chitinfilaments im Lumen der Tracheen von *Drosophila* Embryonen essentiell (Tonning et al., 2005), da sie Chitin zu Chitosan deacetylieren (Luschnig et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Exozytose von Verm in *sinu* Mutanten gestört ist (Wang et al., 2006). Dies führt zu einer Missorganisation des Chitinfilaments im Tracheensystem und ruft wahrscheinlich die Elongation desselben hervor (Wang et al., 2006). Ferner wird angenommen, dass dies auf den misslokalisierten *septate junctions* Komplex zurückzuführen ist (Wang et al., 2006). Ab Stadium 16 ist in *sem* mutanten Embryonen ebenfalls die Exozytose von Serp und Verm gestört und eine Anreicherung dieser Proteine innerhalb des apikalen Bereichs der Tracheenzellen festzustellen (siehe 2.2.7). Interessanterweise sind in *sem* mutanten Embryonen bis einschließlich Stadium 15 Serp und Verm im Tracheenlumen lokalisiert (siehe 2.2.7). Gleiches konnte im Rahmen dieser Arbeit in *mega* mutanten Embryonen beobachtet werden (siehe 2.3.3). Daher ist anzunehmen, dass es in früheren Embryonen trotz misslokalisierten *septate junctions* Komponenten zu einer korrekten Exozytose der Chitin-Deacetylasen Serp und Verm kommt. Dies zeigt, dass es für die frühe Exozytose in Tracheenzellen einen weiteren Regulationsmechanismus geben muss, der nicht von dem korrekten Aufbau der *septate junctions* abhängig ist.

Die *sem* mutanten Embryonen stimmen in allen bisher beschriebenen Phänotypen, mit denen von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen überein (Behr et al., 2003; Wu et al., 2004; Wang et al., 2006, siehe Abschnitt 2.2 und 2.3.3). Daher ist Sem als ein weiteres Claudin anzusehen und anhand der bisherigen Datengrundlage ist davon auszugehen, dass es keine weiteren Claudine in *Drosophila* gibt. Verglichen mit Vertebraten Claudinen stellt sich die Frage nach möglichen Unterschieden zwischen den drei *Drosophila*-Claudinen. Anders als in Vertebraten ist in *Drosophila* kein Unterschied der Expressionsmuster von *mega*, *sinu* oder *sem* zu beobachten. Sie werden alle ab Stadium 14 in dem Tracheensystem, dem Hinterdarm, den Speicheldrüsen, der Epidermis und der Mittellinie exprimiert (eigene Beobachtungen), und auch die bisher beschriebenen mutanten Phänotypen zeigen keine Unterschiede. Der einzige Unterschied, der zwischen *mega*, *sinu* oder *sem* mutanten Embryonen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte, war auf elektronenmikroskopischer Ebene festzustellen. Zwar gab es von *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen bereits elektronenmikroskopische Aufnahmen, aber da diese



in unterschiedlichen Laboren durchgeführt wurden, sind sie aus Erfahrung (persönliche Kommunikation mit Dietmar Riedel) nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. Daher führte Dietmar Riedel für alle mutanten *Drosophila* Claudine elektronenmikroskopische Aufnahmen durch (4.6.7). In *mega*, *sinu* oder *sem* mutanten Embryonen konnten noch Septae nachgewiesen werden, aber es sind deutlich weniger als im Wildtyp und die Septae sind auch nicht so regelmäßig angeordnet wie in Wildtyp Embryonen (siehe 2.2.8). In *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen konnten diese vereinzelt Septae noch im Tracheensystem, im Hinterdarm und in der Epidermis nachgewiesen werden. In *sem* mutanten Embryonen wurden einzelne Septae noch im Hinterdarm und in der Epidermis gefunden, konnte in fünf untersuchten *sem* mutanten Embryonen keine Septae in den Tracheen beobachtet werden. Dieser Sachverhalt ist in sofern erstaunlich, da kein weiterer Unterschied zwischen *sem* mutanten Embryonen und *mega* oder *sinu* mutanten Embryonen festgestellt werden konnte. Ferner handelt es sich bei den untersuchten *mega* mutanten Embryonen um definierte *lack of function* Mutanten (*mega*<sup>VIII</sup>), während die untersuchten *sem* mutanten Embryonen lediglich einen einzelnen Aminosäureaustausch aufweisen. Diese Beobachtungen weichen von den bisherigen Beobachtungen ab. Bisher wurde auch in *mega* mutanten Embryonen keine Septae in den Tracheen beobachtet (Behr et al., 2003) und in *sinu* mutanten Embryonen konnten noch Tenidienausstülpungen beobachtet werden (Wu et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde das *gene targeting* durch homologe Rekombination (Gong und Golic, 2003) erfolgreich für *mega* angewendet, und es konnten mit *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> zwei definierte *lack of function* Allele für *mega* identifiziert werden (siehe 2.3.1). Die hemizygoten Embryonen der Linien *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> sind embryonal letal, in ihnen kann kein Mega Protein detektiert werden, der *septate junction* Marker Coracle (Fehon et al., 1994) ist misslokalisiert, das Tracheensystem ist elongiert, es kommt zu keiner *liquid clearance* der Tracheen, Serp und Verm sind ab Stadium 16 misslokalisiert und die transepitheliale Barriere ist beeinträchtigt (siehe 2.3.3). Darüber hinaus ist eine Beeinträchtigung in der Organisation der Septae in den trachealen *septate junctions* zu beobachten (siehe 2.2.8). Die Erwartungen, dass die Phänotypen dieser *lack of function* Mutanten von *mega* stärker sein könnten als die der bisher beschriebenen EMS-Allele oder P-Elementinsertionslinien (Behr et al., 2003),

konnten nicht bestätigt werden. Die Allele *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> weisen noch eine Besonderheit auf. So wurde gleichzeitig mit dem Austausch von dem *mega* Gen zu dem mini-*white*<sup>+</sup>-Gen noch zwei att-Sites mit ins Genom eingebracht, die das mini-*white*<sup>+</sup>-Gen flankieren (siehe 2.3.1). Über att-Sites ist es möglich schnell, effizient und gezielt Konstrukte in das Genom von *Drosophila* zu integrieren. Dies war auch bei den mini-*white*<sup>+</sup>-Gen flankierenden att-Sites die Grundüberlegung. Denn so könnten modifizierte *mega* Konstrukte gezielt an den ursprünglichen Genort von *mega* integriert werden. Somit wäre es in verhältnismäßig kurzer Zeit möglich viele verschiedene *mega* Transformanten zu etablieren. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit das Potential der *mega*<sup>I</sup> und *mega*<sup>VIII</sup> Mutanten aus zeitlichen Gründen nicht vollständig genutzt werden. So bleiben die Möglichkeiten, die die flankierenden attB-Sites des *white*<sup>+</sup> Gens bieten, bisher unerprobt. Die Methode bietet zukünftig die Möglichkeit Positionseffekte bei Transformanten von *mega* Konstrukten auszuschließen, wobei diese Möglichkeit auch von den etablierten att Linien von der Arbeitsgruppe Basler (Bischof et al., 2007) bestehen würde. Allerdings wäre die neu etablierte Methode sehr zeitsparend, da die Transformanten nicht wie bisher noch zusätzlich in den *mega* mutanten Hintergrund gekreuzt werden müssten. Das Konstrukt würde sich in der ursprünglichen Lokalisation des *mega* Gens befinden, ohne eine erneute zeitaufwendige Homologe Rekombination durchführen zu müssen.

Wie bereits erwähnt, war die Kombination des *gene targetings* durch homologe Rekombination und der gezielte Austausch über att-Sites dazu gedacht das am besten untersuchte Claudin in *Drosophila* noch näher zu charakterisieren und so mehr über den Aufbau der *septate junctions* zu erfahren. Zunächst war geplant die Fliegen mit einem *mega*-attP-Konstrukt zur Lebensfähigkeit zu retten und somit die Effizienz und die praktische Durchführung der Methode zu überprüfen. Als nächster Schritt sollte der essentielle Bereich von Mega eingegrenzt werden. Dazu war geplant chimäre Konstrukte von Mega und den *Drosophila*-Claudinen Sem und Sinu zu klonieren. In diesen sollte beispielsweise der N-Terminus von Mega gegen den N-Terminus von Sem ausgetauscht werden, während der Rest des Proteins unverändert bleibt. Damit kann überprüft werden, ob der N-Terminus von Mega essentielle Funktionen hat, lediglich für die Gesamtstruktur wichtig ist und zur Aufrechterhaltung dieser eine vergleichbar homologe Aminosäuresequenz

ausreichend ist. Gleiches war auch für die erste extrazelluläre Schleife und den C-Terminus von Sem geplant sowie für die Chimären zwischen Mega und Sinu.

Da Mega mit 256 Aminosäuren eine vergleichsweise kleine *septate junctions* Komponente ist, wäre es als weiteres Experiment angebracht jede einzelne Aminosäure unabhängig voneinander zu mutieren und zu analysieren, um den einzelnen Aminosäuren eine spezifische Funktion zuordnen zu können. Zusammenfassend bietet sich hier ein interessantes Tool, um die Funktion von Claudinen in Invertebraten zu verstehen und daraus Rückschlüsse auf die Funktion von Claudinen in Vertebraten zu ziehen.

Zwar haben die Claudine in *Drosophila* und die Vertebratenclaudine viele Übereinstimmungen, allerdings stellt sich die Frage, ob sie die gleiche Funktion ausüben. Jedes Epithelgewebe in Vertebraten hat eine einzigartige Zusammensetzung von Claudinen, die es den unterschiedlichen Epithelien ermöglicht die verschiedensten Kompartimente zu etablieren (Tepass et al., 2001). Die Vertebratenclaudine sind in den *tight junctions* lokalisiert und die unterschiedlichen Kombinationen der Claudine ermöglichen durch hetero- und homophile Interaktionen den Aufbau und die Regulierung der Permeabilitätsbarriere des jeweiligen Epithels (Lal-Nag und Morin, 2009). In dem Bereich der *tight junctions* kommen sich die Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen so nah, dass selbst im Elektronenmikroskop kein Zwischenraum zwischen den Plasmamembranen der benachbarten Zellen zu erkennen ist, und die Claudine der gegenüberliegenden Zellmembranen Interaktionen ausüben können. Daher spricht man in diesem Zusammenhang auch von *kissing cousins* (Hortsch und Margolis, 2003). Im Gegensatz dazu ist das Expressionsmuster der drei *Drosophila*-Claudine Mega, Sinu und Sem nicht voneinander zu unterscheiden, da sie in allen Epithelgeweben exprimiert werden. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, dass Claudine benachbarter Zellen direkt miteinander interagieren, da selbst in den *septate junctions* der Abstand der benachbarten Zellen zu groß ist (persönliche Kommunikation mit Dietmar Riedel). In Folge dessen ist es fraglich, ob Claudine an der Regulation der Permeabilitätsbarriere der Epithelien direkt beteiligt sind oder lediglich eine von vielen Komponenten des Strukturelements *septate junctions* darstellen, ohne das die *septate junctions* nicht korrekt ausgebildet werden können. Um diese Überlegung eindeutig zu beantworten, sind Mutanten unerlässlich in

denen jeweils nur eine Aminosäure mutiert ist und die dabei den Komplex der *septate junctions* nicht zerstören. Wenn diesen mutierten Aminosäuren spezifische Funktionen zugeordnet werden können, dann kann eine Aussage zu der Funktion des jeweiligen Claudins getroffen werden.

Bei diesen Überlegungen ist davon auszugehen, dass alle bekannten Komponenten der *septate junctions* notwendig sind, damit die *septate junctions* korrekt ausgebildet werden und die Funktion der Permeabilitätsbarriere wahrnehmen können. Dies beantwortet aber nicht die Frage nach der Funktion der Claudine in *Drosophila*. Wie aber durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte, haben alle drei Claudine ihre Berechtigung, da die Funktionen der Claudine für die Bildung der *septate junctions* essentiell und unterschiedlich sind.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Puffer und Lösungen

In der Regel wurden Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Die Konzentrationsfaktoren sind in Klammern angegeben. Die feucht autoklavierten Lösungen (121°C, 45min) sind mit „\*“ und sterilfiltrierte Lösungen mit „\*\*“ gekennzeichnet. Bei Lösungen, die nicht bei RT aufbewahrt wurden, ist die Temperatur in Klammern angegeben. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Gewichtseinheit pro Volumeneinheit.

Ampicillin-Lösung** (-20°C):	100mg/ml
Auftragspuffer für DNA (6x):	0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylen Cyanol FF, 15% Ficoll 400
BBS (10x) (-20°C):	100mM Tris, 550mM NaCl, 400mM KCl, 70mM MgCl <sub>2</sub> , 50mM CaCl <sub>2</sub> , 200mM D(+)-Glucose, 500mM Saccharose, pH 6,9
BBT (4°C):	BBS (1x), 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1% Tween20
Chloramphenicol:	170g/ml Ethanol
dNTP-Lösung (-20°C):	2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dTTP, 2mM dGTP
Embryo-Waschpuffer:	70mM NaCl, 0,1% TritonX
Ethidiumbromid-Lösung (4°C):	10mg/ml
Fixierlösung:	10% Paraformaldehyd in PBS, 50mM EGTA, pH 7,0
50% DanKlorix®-Lösung:	äquivalent zu 2,5% Natriumhypochlorit-Lösung
PBS* (10x):	1,3M NaCl, 100mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer pH 7,4
PBT:	PBS (1x), 0,1% Tween20
Proteinase K-Lösung (-20°C):	5mg/ml für DNA-Gewinnung aus Einzelfliegen und Einzelembryonen
SB:	10mM Tris pH 8,5, 1mM EDTA pH 8,5, 25mM NaCl, 200µg/ml Proteinase K
TBE-Puffer (5x):	450mM Tris-Base, 450mM Borsäure, 10mM EDTA pH 8,2
Tetracyclin-Lösung (-20°C):	10mg/ml, 50% Ethanol

## 4.2 Nährmedien für Fliegen

- Fliegenfutter: 8g Agar-Agar, 18g Trockenhefe, 10g Sojamehl, 80g Maismehl, 7g Rübensirup, 80g Malzextrakt, 6,3ml Propionsäure, *ad.* 1l Leitungswasser
- Apfelagar: 1l Apfelsaft, 100g Zucker, 95g Agar-Agar, 40ml 15% Nipagin (in 95% Ethanol), *ad.* 1l Leitungswasser
- Hefe: Presshefe (Bäckerhefe) wurde mit etwas Leitungswasser zu einer homogenen Masse verrührt

## 4.3 Nährmedien für Bakterien

- LB-Medium: 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, *ad.* 1l Wasser, pH der Lösung: 7,0
- LB-Agar: 1l Luria-Bertani-(LB)-Medium, mit 15g Agar-Agar, pH des Agars: 7,0

Die Bakterien-Medien sowie der Agar wurden mit deionisiertem Wasser (*ad.* 1l) angesetzt und anschließend autoklaviert (45min, 121°C).

Herstellung der LB-Agar-Platten:

Der LB-Agar wurde aufgekocht und auf 45°C abgekühlt. Sterile Petrischalen (Ø 9cm) wurden mit ungefähr 20ml flüssigem LB-Agar gefüllt und bei RT stehen gelassen, bis der LB-Agar erstarrt war. Nicht sofort verwendete Platten wurden bei 4°C aufbewahrt. Antibiotikahaltige Agarplatten wurden nach dem Abkühlen auf 45°C mit dem jeweiligen Antibiotikum vermengt.

## 4.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken

Wenn nicht anders beschrieben wurden Standard-Methoden nach den Protokollen von Sambrook, J., 1989 durchgeführt.

### 4.4.1 Bakterienstämme

XL 1-Blue (Stragene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*( $r_k^- m_k^+$ ), *supE44*, *relA1*,  
*lac* [*F'* *proAB*, *lacI<sup>q</sup>*Δ*M15*, Tn10(*tet<sup>r</sup>*)]

Zur kurzfristigen Lagerung wurden Bakterienstämme auf LB-Agarplatten ausgestrichen, ü.N. bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Langfristige Lagerungen erfolgten bei -80°C, dazu wurden die Bakterienzellen in Glycerin überführt.

### 4.4.2 Extraktion genomischer DNA mit QIAGEN® DNeasy Tissue Kit

Ungefähr 30 durch Kälteschock getötete Fliegen wurden zur DNA-Isolierung in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, 180μl PBS zugegeben und mit einem Mikropistill mechanisch homogenisiert. Die weitere Prozedur entsprach der Anleitung des QIAGEN® DNeasy Tissue Kit.

### 4.4.3 DNA Präparation zur Genotypbestimmung von einzelnen Organismen

Um aus einzelnen Fliegen DNA zu präparieren, wurden diese zunächst eingefroren und dann in 50μl SB und 1μl Proteinase K (5mg/ml) mechanisch mit einem Mikropistill zerkleinert. Bei einem einzelnen Embryo wurden 9μl SB und 1μl Proteinase K (25mg/ml) verwendet und dieser mechanisch mit einer Pipettenspitze zerkleinert. Das so gewonnene Homogenisat wurde für 30min bei 37°C inkubiert. Die Proteinase K wurde durch Erhitzen auf 72°C für 20min inaktiviert (Gloor et al., 1993).



#### **4.4.4 Restringieren der DNA**

Es wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, um DNA zu charakterisieren, isolieren oder linearisieren. Für analytische Zwecke wurde je 1 µg DNA bzw. 0,5 µg Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen in einem Endvolumen von 20 bis 40 µl in der Regel für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. In präparativen Fällen wurden entsprechend größere Mengen DNA verwendet und gegebenenfalls länger mit den Restriktionsenzymen behandelt (zwei bis fünf Stunden). Gemäß den Pufferansprüchen der Enzyme wurden die Restriktionen in verschiedenen Puffertypen (NEB 1, 2, 3 und 4) durchgeführt.

#### **4.4.5 Dephosphorylierung restringierter DNA**

Die Dephosphorylierung verhindert, dass Plasmid-DNA nach der Restriktion aufgrund komplementärer Einzelstrangüberhänge mit sich selbst ligiert. Daher wurden 1–10U Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) nach der Restriktion zu dem Lösungsansatz hinzu pipettiert. Die Dephosphorylierung erfolgte für 15min bei 37°C. Das Enzym wurde danach durch eine Inkubation bei 65°C für 15min inaktiviert.

#### **4.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Restringierte Vektor-DNA wurde mit zwei- bis dreifachem molekularem Überschuss des isolierten DNA-Fragmentes mit 1/10 Volumen 10x Ligationspuffer und 1U T4-DNA-Ligase für 20min bei RT ligiert.

#### 4.4.7 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in Abhängigkeit von ihrer Länge in verschiedenen konzentrierten Agarosegelen (0,8–1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (Gibco BRL, Eggenstein) wurde durch Aufkochen in 0,5x TBE-Puffer gelöst, Ethidiumbromid-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 40 µg/100ml zugefügt, und die etwas abgekühlte Agaroselösung in eine Gelwanne gegossen, in die zum Aussparen der Geltaschen ein sogenannter Kamm eingehängt wurde. Das erkaltete Gel wurde in die Elektrophoresekammer gelegt, der Kamm gezogen, und die Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt bis das Gel vollständig bedeckt war. Die DNA-Proben wurden je mit 1/5 Volumen Auftragspuffer gemischt und in die Geltasche gefüllt. Die Elektrophorese wurde im Spannungsbereich von 50 – 120 Volt durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Längenmarker (1kb-„ladder“, Gibco-BRL) mitaufgetragen. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator bei 366nm sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation mit dem „Video-Copy-Prozessor“ aufgenommen.

#### 4.4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und gewogen. Die Extraktion wurde mit dem Machery-Nagel Nucleo Spin® Extract II (250)-Kit entsprechend der Anleitung des beiliegenden Protokollheftes durchgeführt.

#### 4.4.9 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Um Vektoren zu vervielfältigen, wurden zur DNA-Aufnahme kompetente Zellen benötigt. Dazu wurden 50ml LB-Medium mit Tetracyclin (10 µg/ml) mit einer *E. coli* XL-1 Kolonie (siehe 4.4.1) angeimpft und bei 37°C ü.N. auf dem Schüttler inkubiert. 1l LB-Medium wurde mit 20ml dieser Kultur angeimpft, und die Bakterien wurden bis zu einer optischen Dichte bei 600nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5 bis 0,7 bei 37°C auf dem

Schüttler inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf Eis oder bei 4°C gearbeitet. Dann wurden die Zellen bei 4000Upm für 10min abzentrifugiert. Zum Pellet wurde 300ml 4°C kaltes 10%iges steriles Glycerin gegeben und resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 100ml, 50ml und zum Schluss in 2ml 10%igem sterilem Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **4.4.10 Bakterientransformation durch Elektroporation**

Ein Aliquot der eingefrorenen kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen (siehe 4.4.1) wurde auf Eis aufgetaut, 50µl davon mit 1µl der DNA-Lösung gemischt und in eine Elektroporationsküvette (BioRad) gegeben. Anschließend wurde der „Pulse-Generator/Capacitor“ auf folgende Parameter eingestellt: 25µFD, 2,3kV und 200W. Die Küvette wurde in den vorgekühlten Schlitten gestellt und Spannung angelegt. Sofort wurden 500µl LB-Medium in die Küvette pipettiert, gemischt und 45min bei 37°C in einem Eppendorfreaktionsgefäß inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf einer für das Selektionssystem geeigneten Agarplatte (mit Ampicillin oder Chloramphenicol) ausplattiert. Nach der Inkubation der Bakterienplatten ü.N. bei 37°C wurden die Bakterienkolonien entweder sofort analysiert oder die Bakterienplatten wurden bei 4°C aufbewahrt.

#### **4.4.11 Plasmid Präparationen**

**Mini Präparation:** 3ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Anleitung des im QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) beiliegenden Protokollheftes.

**Midi-Präparation:** 50ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C

geschüttelt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der Anleitung des im QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25) beiliegenden Protokollheftes.

#### 4.4.12 Analyse und Amplifikation von DNA mit der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl. *polymerase chain reaction* genannt) ermöglicht die schnelle sequenzspezifische Amplifikation kleinerer DNA Mengen. Hierbei wird die Matrizen-DNA (engl. *template* genannt) denaturiert, so dass sich Oligonukleotide an die DNA-Stränge und -Gegenstränge anheften können, die wiederum als Erkennungspunkt zur Vervielfältigung der DNA-Stränge durch eine hitzestabile Polymerase (GoTaq® DNA Polymerase, Stratagene; Pfu Ultra II™ Fusion HS DNA Polymerase, Promega) benutzt werden. Die Oligonukleotide wurden bei MWG BiotechAG (Ebersberg) in Auftrag gegeben und hergestellt. Sie wurden in einer Konzentration von 10pmol/ml eingesetzt.

Ein PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 1ng Template-DNA
- 1µl dNTPs
- 1µl 5'-Primer
- 1µl 3'-Primer
- 2,5µl 10x Puffer
- 0,5µl DNA-Polymerase (Taq oder Pfu)
- mit Wasser auf 25µl auffüllen

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Das Temperaturprogramm beginnt mit einem Denaturierungsschritt (5min 95°C), anschließend folgen 30 Zyklen, die sich aus einem Denaturierungsschritt (30sek bei 95°C), einem Anlagerungsschritt der Primer (Annealing, 1min bei primerspezifischer Temperatur, die zwischen 45°C und 65°C liegen kann) und einem Elongationsschritt, der je nach Länge des zu amplifizierenden Abschnitts und nach der Effizienz der verwendeten Polymerase variieren kann (72°C für Taq- bzw. Pfu-Polymerase), zusammensetzen. PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und überprüft, ob die erhaltenen Banden den Erwartungen entsprechen. Sofern mit den

erhaltenen PCR-Fragmenten weiter gearbeitet werden sollte, wurde ein präparatives Agarosegel verwendet und mit den DNA-Banden wurde wie unter 4.4.8 beschrieben weiter verfahren.

#### **4.4.13 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Die Ligation der aufgereinigten DNA (siehe 4.4.8) aus einer PCR (siehe 4.4.12) wurde mit dem Invitrogen TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing entsprechend der Anleitung des beiliegenden Protokollhefts durchgeführt.

#### **4.4.14 Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung**

Ausgehend von 1 µg doppelsträngiger DNA gelöst in Wasser, (gemessen wurde mit dem NanoDorp (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen), und in der ISS110 SpeedVac (Thermo SCIENTIFIC, Waltham MA USA) getrocknet, konnte der zwischen zwei Oligonukleotiden gelegene Sequenzbereich durch wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung und DNA-Synthese exponentiell vermehrt werden. Hierfür war eines der Oligonukleotidpaare komplementär zu einem Sequenzbereich am 3'-Ende der DNA und es erfolgte eine Amplifikation der DNA vom proximalen Ende des genomischen DNA-Fragmentes. Das andere Oligonukleotid war zu einem Bereich am 5'-Ende der DNA komplementär und die Amplifikation der DNA erfolgte in das distale Ende des genomischen DNA-Fragmentes hinein. Aufgrund des Denaturierungsschrittes wurde eine hitzestabile Taq-Polymerase verwendet. Die Arbeit der Sequenzierung wurde von der Firma eurofins mwg operon übernommen. Die Sequenzierergebnisse wurden elektronisch zur Verfügung gestellt.

#### **4.4.15 *in silico* Sequenz-Analysen**

Zur computerunterstützten Sequenzanalyse wurden die Programme DNA-Star EditSeq und MegAlign verwendet.

Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Programme TMHMM 2.0 (transmembrane hidden Markov model) untersucht. Die aufgeführten Programme waren zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorgelegten Arbeit unter folgender Internet-Adresse frei zugänglich: CBS (Center For Biological Sequence Analysis, [www.cbs.dtu.dk/index.shtml](http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml)), [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) (TMHMM 2.0). DNA-Sequenzen wurden von FlyBase (<http://flybase.org>) und von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen.

#### 4.4.16 Klonierung des P{*mega-w<sup>+</sup>-mega*}-Konstruktes

Zunächst wurde aus Fliegen des Df(l)*w*<sup>67c23</sup> Stammes genomische DNA isoliert (siehe 4.4.2). Diese DNA diente als Template für zwei PCRs (siehe 4.4.12), in denen zum einen mit dem Primern *mega*-4kb KpnI und *mega*-4kb NotI der benötigte *mega upstream* Bereich und zum anderen mit den Primern *mega*+4kb MluI und *mega*+4kb XhoI der benötigte *mega downstream* Bereich amplifiziert wurde. Die benötigten attB-Sites wurden aus dem Vektor pDrBB2 (Groth et al., 2004; Tabelle 4.5) mit den Primern attB KpnI NotI und attB XhoI sowie mit attB StuI NotI und attB SphI in jeweils einer PCR (4.4.12) amplifiziert (für die Sequenz der verwendeten Primer siehe Tabelle 4.4). Anschließend wurden alle vier DNA Fragmente jeweils in TOPO kloniert (siehe 4.4.13), sequenziert (siehe 4.4.14) und ausgewertet (siehe 4.4.15).

Die attB-Sites wurden nacheinander durch Restriktion (siehe 4.4.4) zum einen mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI und zum anderen mit den Restriktionsenzymen StuI und SphI in den pBS-70w-Vektor (Adams et al., 2003; siehe Tabelle 4.5) kloniert (siehe 4.4.6 und 4.4.7). Die *mega* Fragmente wurden nacheinander durch Restriktion (siehe 4.4.4) mit den Restriktionsenzymen KpnI und NotI beziehungsweise MluI und XhoI in den pP{EndsOut2}-Vektor (Adams et al., 2003; siehe Tabelle 4.5) kloniert (siehe 4.4.6 und 4.4.7). Anschließend wurde das mini-*white<sup>+</sup>*-Gen aus dem pBS-70w-Vektor flankiert von den beiden attB-Sites ebenfalls in diesen pP{EndsOut2}-Vektor durch Restriktion (siehe 4.4.4) mit dem Restriktionsenzym NotI kloniert (siehe 4.4.6 und 4.4.7). Damit war das P{*mega-w<sup>+</sup>-mega*}-Konstrukt vollständig und wurde dann in Embryonen des Df(l)*w*<sup>67c23</sup> Stammes injiziert (siehe 4.6.3).

## 4.5 Färbungen an *Drosophila*-Geweben

### 4.5.1 Sammeln von Embryonen

Zum Sammeln von Embryonen wurden die Fliegen in einen Becher mit einer Apfelsaftagarplatte, die mit Hefe bestrichen war, gesetzt. Nach verschiedenen Entwicklungszeiten wurden die Embryonen gesammelt und gründlich mit Wasser gewaschen.

### 4.5.2 Hitzefixierungen von Embryonen

Für Antikörperfärbungen führt eine mildere Fixierung ohne Paraformaldehyd zu einem besseren Färbeergebnis. Die Dechorionierung erfolgte mit 50% Klorix (Colgate-Palmolive) für 3min. Die Embryonen wurden anschließend in ein Glasszintillationsgefäß mit 10ml 80°C heißem Embryo-Waschpuffer überführt und dort 10sec inkubiert. Durch Zugabe von 10ml raumtemperaturwarmem Embryo-Waschpuffer wurden sie abgekühlt und das Gefäß anschließend für 2min auf Eis inkubiert. Der Puffer wurde nach dem Absinken der Embryonen abgenommen und durch 10ml Methanol und 6ml Heptan ersetzt. Durch kräftiges Schütteln erfolgte die Entfernung der Vittellinmembran. Durch Waschen mit Methanol wurden Embryo-Bruchstücke und Heptan entfernt. Die Embryonen wurden in Methanol bei -20°C aufbewahrt.

### 4.5.3 Fluoreszenz-Antikörperfärbungen an Embryonen

Hitzefixierte Embryonen wurden aus Methanol zur Rehydratisierung in mehreren Verdünnungsschritten in BBT überführt. Die Inkubation mit Primärantikörpern (Konzentrationen: siehe Liste verwendeter Primärantikörper), die zuvor präabsorbiert wurden, wurde ü.N. bei 4°C durchgeführt. Wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, so wurden die Embryonen mit beiden Primärantikörpern gleichzeitig



inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die beiden Primärantikörper aus verschiedenen Spezies gewonnen wurden. Nicht gebundener Antikörper wurde am nächsten Tag durch sechsmaliges Austauschen von BBT und mindestens einer halben Stunde Inkubation auf dem Drehrad bei Raumtemperatur ausgewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der mit Alexa Fluor® 488 oder 568 gekoppelt war, der gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichtet war und daher nach der Spezies ausgewählt wurde, in der der Primärantikörper hergestellt worden war, wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Drehrad durchgeführt. Bei Doppelfärbungen fand ebenfalls die Inkubation mit beiden sekundären Antikörpern zur gleichen Zeit statt. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch achtmaliges Austauschen von PBT ausgewaschen. Die anschließende Einbettung der Embryonen erfolgte in ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen).

#### **4.5.4 Lumen Färbung des Tracheensystems**

Um das Tracheensystem in hitzefixierten Embryonen anzufärben, wurde Rhodamine-conjugated Chitin-binding Probe (cbp; #P5210S; New England Bio Labs Inc.) verwendet. Dieses wurde wie ein direkt gekoppelter sekundärer Antikörper eingesetzt. Dazu wurden hitzefixierte Embryonen aus Methanol zur Rehydratisierung in mehreren Verdünnungsschritten in BBT überführt. Anschließend wurde cbp 1:500 verdünnt in BBT zu den Embryonen gegeben, und diese zwei Stunden bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit PBT beendet. Die anschließende Einbettung der Embryonen erfolgte in ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen).

#### 4.5.5 Herstellung von Antikörpern

Polyklonale Antiseren gegen Sesam (Sem) und Sinuous (Sinu) wurden bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben.

Dabei wurden zwei verschiedene für Sem spezifische Peptide (ISEYGDEYYQNQGPPSC und CSRPRRPQQSSASNSA) verwendet, die beide in zwei Kaninchen injiziert worden. Die Bezeichnung der Kaninchen lautete SA2365 und SA2366. Wobei für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sem-Färbungen 1:50 präabsorbiertes Serum des Tieres SA2365 verwendet wurde.

Für Sinu wurden ebenfalls zwei verschiedene für Sinu spezifische Peptide (QKPSHFAREDSQEHLIC und YSRTSLRRNILTNSFW) in jeweils zwei Meerschweinchen injiziert. Das präabsorbierte Serum wurde 1:100 für Sinu-Färbungen eingesetzt.

Für die einzelnen Boosts wurde den entsprechenden Tieren KLH-MBS-Komplex gekoppeltes Peptid injiziert, dabei sieht das Protokoll nach jedem Boost eine Pause von vier Wochen vor. Wobei zwei Wochen nach einem Boost Blut abgenommen wurde, um dieses mit ELISA zu testen. Sobald die ELISA Ergebnisse eindeutig waren, wurden die Tiere ausgeblutet. Das so gewonnene Serum wurde in verschiedenen Verdünnungen an hitzefixierten Embryonen von *Drosophila* getestet.

Gegen Mega wurde ein monoklonaler Maus IgG Antikörper bei der Firma GenScript bestellt. Dazu wurde das Peptid GYQPPRHHHSQSRSLC, mit dem bereits zuverlässig polyklonales Antiserum in Kaninchen gewonnen wurde (Behr M., Dissertation Braunschweig 2003) verwendet.

Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern wird zunächst einer Maus das Peptid injiziert (Köhler et al., 1975). Diese bildet im Zuge der Immunantwort B-Lymphozyten, die Antikörper bilden und sich in der Milz anreichern. Die Milz wird diesen Tieren entfernt und die B-Lymphozyten isoliert. Die einzelnen B-Lymphozyten werden mit Plasmazellen einer Tumor-Zelllinie fusioniert, es entstehen dabei so genannte Hybridomzelllinien. Die Hybridomzelllinien haben sowohl die Eigenschaft einen bestimmten Antikörper zu produzieren als auch die Fähigkeit sich in Kultur unbegrenzt zu vermehren. Zur Überprüfung der Spezifität der einzelnen Hybridomzelllinien wurden die Zellüberstände im ELISA getestet.

## 4.6 Embryologie und Genetik

### 4.6.1 Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm diente *Oregon R* (oreR). Durch homologe Rekombination gewonnene Mutantenlinien und P-Elemente tragende Fliegenlinien, wurden zur Identifizierung homozygoter Embryonen mit Fliegen, die *Balancer*-Chromosome haben, gekreuzt, die verschiedene dominante Marker besitzen (*Serrate*, *Stubbled*). Allgemeine Methoden der Genetik und der Embryologie sind in Ashburner, M., 1989 und Greenspan, R., 1997 beschrieben. Eine Liste der verwendeten Fliegenlinien findet sich in der Tabelle 4.3.

### 4.6.2 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden in unterschiedlich großen Kunststoffgefäßen gehalten, die zu etwa einem Viertel mit Futter gefüllt waren. Um den Puppen und geschlüpften Fliegen eine feste Unterlage zu geben, wurde ein Faltenfilter in das Futter gesteckt. Die Röhrchen wurden durch einen mit Watte umwickelten Ceaprenstopfen verschlossen. Je nach gewünschter Generationsdauer wurden die Fliegenstämme bei 18°C oder 25°C gehalten. Alle zwei bis vier Wochen wurden die Fliegen in frische Futtergefäße überführt. Um Kreuzungen durchführen zu können, wurden die Fliegen über eine Fritte mit Kohlendioxid kurzfristig betäubt und entsprechend ihrer phänotypischen Marker gesammelt.

### 4.6.3 Injektion von Konstrukten zur Herstellung transgener Fliegen

Die Injektion von DNA Konstrukten in *Drosophila* Embryonen wurde von Tomma Eisbein in derselben Abteilung oder von der Firma VANEDIS injection service IMBV (Oslo, Norwegen) durchgeführt. Dazu wurden bis zu 30min alte Embryonen

dechorioniert, aufgereiht und mit einem Heptankleber auf ein Deckglas geklebt. In das posteriore Ende wurde eine geringe Menge gereinigter Vektor mit Femtotips Mikroinjektionskapillaren und dem Transjector 5246 (beides Eppendorf, Hamburg) injiziert.

#### 4.6.4 *gene replacement* durch homologe Rekombination

Das Konstrukt für *gene replacement* durch homologe Rekombination umfasst das *mini-white<sup>+</sup>*-Gen aus dem Vektor pBS-70w (siehe Tabelle 4.5), das von beiden Seiten von attB-Sites flankiert wird (Ursprungsvektor pDrBB2, Groth et al., 2004) abschließend auf einer Seite 4kb upstream des auszutauschenden Genes und auf der anderen Seite 4kb downstream. Dieses Konstrukt wurde in den Vektor pP{EndsOut2} (Adams et al., 2003; siehe Tabelle 4.5), der *upstream* und *downstream* der *multiple cloning site* je eine FLP *recombination target* (FRT) und eine I-SceI (*site-specific endonuclease*) Erkennungssequenz enthält, kloniert und in Embryonen injiziert (siehe 4.6.3). Von den daraus resultierenden Fliegen *w*; P{Donor} wurden Jungfrauen gesammelt und diese mit Männchen, die Flp und I-SceI unter einem Hitzeschockpromotor exprimieren, gekreuzt

$$\text{♀ } w/w; P\{Donor\}/P\{Donor\} \times \text{♂ } w/Y; P\{70FLP\} P\{70I-SceI\}/P\{70FLP\} P\{70I-SceI\}$$

Die aus dieser Kreuzung schlüpfenden Larven wurden nach 72 Stunden einem einstündigen Hitzeschock bei 38°C für ausgesetzt, wodurch FLP (*site-specific recombinase*) und I-SceI aktiviert werden. FLP rekombiniert das Konstrukt an den FRT aus dem Gemon als zirkuläres Konstrukt. Linearisiert wird das Konstrukt durch I-SceI (Bellaiche, Y. et al. 1999). Durch zelleigene Reparaturmechanismen kann nun das Konstrukt durch den homologen Bereich mit dem genomischen Bereich ausgetauscht werden. Als Kontrolle, ob eine Aktivierung der unter den Hitzeschock-Promoter stehenden Enzyme FLP und I-SceI stattgefunden hat, dient die mosaikartige Augenfarbe der Fliegen, da so sichtbar ist, dass das P-Element aus dem Augenzellgenom desintegriert wurde. Daher werden aus der oben aufgeführten Kreuzung Jungfrauen mit Mosaik-Augen gesammelt. Hat die homologe Rekombination auch in den Keimbahnzellen stattgefunden, dann schlüpfen aus der folgenden Kreuzung nur Fliegen mit einer einheitlichen *white<sup>+</sup>* Augenfarbe.

♀  $w/w; P\{Donor\}/+; P\{70FLP\} P\{70I-SceI\}/+$  × ♂  $w/Y; P\{70FLP\}10/ P\{70FLP\}10$

Durch das eingekreuzte konstitutive FLP werden falsch positive ausgeschlossen, da eventuelle noch vorhandene FRT heraus rekombiniert werden und diese Fliegen erneut Mosaikaugen aufweisen (Rong und Golic, 2000a; Rong und Golic, 2000b; Rong et al., 2002; Gong und Golic, 2003; Rong und Golic, 2003; Gong und Golic, 2004; Xie und Golic, 2004; Horn und Handler, 2005).

#### 4.6.5 Ektopische Genexpression mithilfe des GAL4-UAS-Systems

Die Funktion des GAL4-UAS induzierten Expressionssystems (Brand & Perrimon, 1993) erfolgte durch eine Zusammenführung eines Induktorkonstruktes (GAL4-Konstrukte, integriert in Fliegenstämmen) und eines Efektorkonstruktes mit einer beliebigen Transkriptionseinheit (UAS-Konstrukt, integriert in Fliegenstämmen). Durch das Kreuzen zweier solcher transgenen Fliegenstämmen erfolgte in der Nachkommenschaft die ektopische Expression eines Gens. Bei UAS-RNAi-Linien wurde eine ektopische Expression bei 25°C durchgeführt.

#### 4.6.6 Texas-Red®-Dextran-10kDa Injektionen in Embryonen

Zur Injektion wurde im Vorfeld das Texas-Red®-Dextran 10kDa (Molecular Probes, D-1828) in 1ml PBT (pH 7,5) aufgenommen, auf 50°C erwärmt und gevortext, um eine homogene Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde dann 15min bei 15000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit einer Millipore Centriprep Säule für 10kDa aufgereinigt. Danach wurde das (-)Scopolaminhydrochlorid (Fluka) abgewogen, in der entsprechenden Menge zugegeben und gemischt. Texas-Red®-Dextran 10kDa wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Für die Injektion wurden die Embryonen dechorioniert (siehe 4.5.2), auf einen Apfelsaftagarstreifen aufgereiht und ausgerichtet. Die Embryonen wurden anschließend mit Hilfe eines Heptan-Kleber auf einen Objektträger überführt und mit Voltalef 10S-Öl (Atochem, Pierre Bénite) bedeckt. Die Injektion erfolgte mit dem

Transjector 5246 (Eppendorf) und sterilen Femitips-II-Nadeln (Silver, Eppendorf) in den posterioren Pol der Embryonen, wobei die für die Injektion benötigte Zeit und der Druck je nach Nadelbeschaffenheit variieren durften. Die Nadel wurde vor der Benutzung mit 10µl des Texas-Red®-Dextran 10kDa mit einer Konzentration von 0,5 mg/µl (-)Scopol-aminhydrochlorid gefüllt. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Embryonen mit einem konfokalen Mikroskop betrachtet, um zu überprüfen, ob der Farbstoff aufgrund einer gestörten transepithelialen Barriere parazellulär in das Tracheenlumen einströmt. Dies wird nach einer Stunde erneut beurteilt.

#### **4.6.7 Elektronenmikroskopie**

Die Embryonen (Anfang Stadium 17) müssen dechorioniert (siehe 4.5.2) und anschließend devitellinisiert werden. Für letzteres reiht man die Embryonen auf einem Apfelagarstück auf, fixiert sie dann über ein Heptan-Kleber-Gemisch an ein Objektgläschen und gibt PBT hinzu, damit sie nicht austrocknen. Mit einer spitzen Glasnadel kann die Vitellinmembran vom Embryo gelöst werden. Die Fixierung der Embryonen erfolgt 10min bei RT mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cocadylatpuffer (pH 7,4) und ü.N. mit 2% Glutaraldehyd bei 4°C. Zur besseren Erhaltung der Membranen schneidet man die Embryonen zur Fixierung in der Mitte durch. Danach folgt eine Fixierung mit 1% Osmiumtetroxid, eine Färbung mit 1% Tanninsäure und 1% Uranylsäure. Schließlich werden die Embryonen dehydriert und mit Agar100 eingebettet. Zur elektronenmikroskopischen Betrachtung müssen dünne Schnitte (30-40nm) angefertigt und mit Uranylacetat gegengefärbt werden. Zur Analyse der Schnitte wird das PhillipsCM120 BioTwin Elektronenmikroskop (Phillips) und eine CCD Kamera (GATAN) benutzt. Die Einbettung der Embryonen, das Schneiden dünner Präparate und eine Hilfestellung bei der Analyse der Präparate am Mikroskop ist freundlicherweise von D. Riedel übernommen worden.

## 4.7 Antikörper, Fliegenstämme, Oligonukleotide und Vektoren

**Tabelle 4.1** Auflistung der Primärantikörper, die für diese Arbeit benutzt wurden

In der linken Spalte sind die einzelnen Primärantikörper aufgelistet. In der mittleren Spalte ist die benutzte Konzentration der Primärantikörper aufgeführt, aus welchen Tier sie gewonnen wurden und ihre Verwendung beschrieben. In der rechten Spalte sind Originalarbeiten aufgeführt und aus welchem Labor die Antikörper stammen.

Antikörper	Verdünnung, Herkunft,	Referenz/ Hersteller
anti-Megatrachea	1:5; Maus	diese Arbeit; GenScript Corporation
anti-Megatrachea	1:400; Meerschweinchen	Peptide Specialty Laboratories GmbH
anti-Sesam	1:50; Kaninchen	diese Arbeit, Eurogentec
anti-Sinuuous	1:100; Meerschweinchen	diese Arbeit, Peptide Specialty Laboratories GmbH
anti-Kasim	1:100; Kaninchen	Küstner, K. Diplomarbeit 2006
anti-Ali baba	1:50; Kaninchen	Gerlach, G. Doktorarbeit 2006
anti-Hot dog	1:1000; Meerschweinchen	Harder, B. Doktorarbeit 2009
anti-Coracle	1:400; Maus	Lamb et al. 1998
anti-serpentine	1:200; Kaninchen	Luschnig et al. 2006
anti-vermiform	1:100; Kaninchen	Luschnig et al. 2006



**Tabelle 4.2      Auflistung der Sekundärantikörper, die für diese Arbeit benutzt wurden**

In der linken Spalte sind die einzelnen Sekundärantikörper aufgelistet. In der mittleren Spalte ist die benutzte Konzentration der Sekundärantikörper aufgeführt, aus welchen Tier sie gewonnen wurden und ihre Verwendung beschrieben. In der rechten Spalte ist aufgeführt von welcher Firma die Antikörper stammen.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung, Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Kanninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Kanninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Meerschweinchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Meerschweinchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	1:500; Ziege	Molecular Probes
anti-Maus Biotin IgM	1:500; Ziege	Jackson ImmunoResearch

**Tabelle 4.3 Auflistung der Fliegenlinien, die für diese Arbeit benutzt wurden**

In der linken Spalte sind die einzelnen Fliegenlinien aufgelistet. In der mittleren Spalte ist die Verwendung der Fliegen beschrieben und in der rechten Spalte sind die Quelle und die Referenz zu der Fliegenlinie angegeben.

Fliegenstamm	Verwendung	Quelle/ Referenz
P(actin5c)-Gal4	ubiquitärer Treiber	R. Schuh; Ito et al., 1997
P(breathless)-Gal4	Treiber Tracheensystem	R. Schuh; Shiga et al., 1996
G455-Gal4	Treiber Mitteldarm	M. Hoch; nicht publiziert
Y48-Gal4	Treiber Ektoderm	Bloomington
Mef2-Gal4	Treiber Mesoderm	Bloomington
Oregon R	Wildtyp	R. Schuh; nicht publiziert
Df(1)w <sup>67c23</sup>	weiße Augen	R. Schuh; Lefevre G., and Green, M.M., 1972
<i>mega</i> <sup>d</sup> /FM7i	<i>mega</i> Mutante	diese Arbeit
<i>mega</i> <sup>viii</sup> /FM7i	<i>mega</i> Mutante	diese Arbeit
<i>sem</i> <sup>B42</sup> /CyO	sesam Mutante	S. Lushnig;
<i>sem</i> <sup>G402</sup> /CyO	sesam Mutante	S. Lushnig;
Df(2R)nap1/DrBG,InGla	<i>sem</i> Defizienz	Bloomington
Df(1)sta;Tp(1;3)sta:ss(sta)	<i>mega</i> Defizienz	Bloomington
RNAi mega VDRC 50306	gewebespezifische Repression von <i>mega</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi sinu VDRC 44928	gewebespezifische Repression von <i>sinu</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi sem VDRC 3962	gewebespezifische Repression von <i>sem</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi kasim VDRC 42480	gewebespezifische Repression von <i>kasim</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi milan VDRC 103556	gewebespezifische Repression von <i>milan</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi ali baba VDRC 102985	gewebespezifische Repression von <i>ali baba</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
RNAi hot dog VDRC 9146	gewebespezifische Repression von <i>hot dog</i>	Vienna Drosophila RNAi Center; Dietzl et al., 2007
<i>sinu</i> <sup>nwu/</sup> /TM6B	<i>sinu</i> Mutante	Bloomington
<i>mega</i> <sup>G0012</sup>	<i>mega</i> Mutante	R. Schuh; Peter et al., 2002
<i>mega</i> <sup>G0044</sup>	<i>mega</i> Mutante	R. Schuh; Peter et al., 2002
w;; P{70FLP} P{70I-SceI}	Hitzechock induzierbares FLP und I-SceI für homologe Rekombination	J.J. Sekelsky; Adams et al., 2003
w; P{70FLP}10	konstitutive FLP für homologe Rekombination	J.J. Sekelsky; Adams et al., 2003

**Tabelle 4.4** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

In der linken Spalte sind die Namen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide angegeben. In der rechten Spalte ist die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide von 5`- in 3`-Richtung angegeben.

Oligonucleotid	Sequenz	Verwendung
kim-4kb_KpnI	GGG GTA CCC AGA GTG TGA GTC AGT AGA GC	Primer zur Amplifikation des 4kb <i>upstream</i> Bereichs von <i>kasim</i> für die homologe Rekombination
kim-4kb_XhoI	CCG CTC GAG GAG CGT GGA TAA GTG TTT GG	
kim+4kb_StuI	AAG GCC TCG CCA ACC AAT TAA GCT TAG C	Primer zur Amplifikation des 4kb <i>downstream</i> Bereichs von <i>kasim</i> für die homologe Rekombination
kim+4kb_SacII	AGG GGC GCC TCG GAT CCT ACC TGA TGA TCC	
white+4kb proof	ATC TGG CTC TAA GAC TTC GG	Überprüfung, ob die Homologe Rekombination stattgefunden hat für <i>kasim</i>
white-4kb proof	TGT CAC CAT TGT TCA GAT GC	
kim-4kb proof	ATC GCA TAC TTG TAC GGT TGC	
kim+4kb proof	AGA ACA AGT GCT ACG ATA CC	
mega-4kb KpnI	GGT ACC TGT GCA AAA CAT TTC GTA TTG G	Primer zur Amplifikation des 4kb <i>upstream</i> Bereichs von <i>mega</i> für die homologe Rekombination
mega-4kb NotI	GCG GCC GCT CAA ATG GCC CCG TCC ACC	
mega+4kb MluI	ACG CGT AAC TTG CGA AGC TAA ACG TAC	Primer zur Amplifikation des 4kb <i>downstream</i> Bereichs von <i>mega</i> für die homologe Rekombination
mega+4kb XhoI	CTC GAG ACG ACT GTA ACC TAT GCG TGC	
attB KpnI NotI	GGT ACC GCG GCC GCG TCG ACG ATG TAG GTC ACG G	Primer zur Amplifikation der attB-Site
attB XhoI	CTC GAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC ATG C	
attB StuI NotI	AGG CCT GCG GCC GCC TCG AGG TCG ACG ATG TAG G	Primer zur Amplifikation der attB-Site
attB SphI	GCA TGC CTT ATC GAT ACC GTC GAC ATG C	
mega-4kb proof	TTA CGA TCC CAA CTA ACG ACC	Überprüfung, ob die Homologe Rekombination stattgefunden hat für <i>mega</i>
mega+4kb proof	CCT GAG CCC CGC AAG ATC TTG CG	
sem EMS 1	CTT TAG GGC GTG TTA TTT TCC	ORF der Sesam EMS Kandidaten amplifizieren, die von Stefan Luschning sind
sem EMS 2	AAC ATT TGT AGT GGA TTT AGT GG	

**Tabelle 4.5**      **Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren**

In der linken Spalte sind die Namen der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren angegeben. In der mittleren Spalte ist die Herkunft der Vektoren aufgelistet. In der rechten Spalte wird erläutert für welche Konstrukte der Vektor verwendet wurde.

<b>Vektor</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Konstrukte</b>
pCR TOPO 2.1	Invitrogen	zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten und Sequenzierung
pBluescript SK	Stratagene	Standard-Vektor für Klonierungen
pUAST	Brand und Perrimon, 1993	UAS sinuous
pDrBB2	Groth et al., 2004	Konstrukt Homologe Rekombination
pP{EndsOut2}	Adams et al., 2003	Konstrukt Homologe Rekombination
pBS-70w	Adams et al., 2003	Konstrukt Homologe Rekombination

## 4.8 Abkürzungen

### Allgemein

Abb.	Abbildung
<i>ad.</i>	<i>Adito</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	et alii
g	Gramm
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
h	Stunde
k	Kilo-
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Milli-
M	Molar
min	Minuten
$\mu$	Mikro-
n	Nanometer
OD	optische Dichte
P-Element	Transposonelement
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunden
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)amminometha

U	<i>Units</i> , Einheit der Enzymaktivität
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius

### Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil

### Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

## 5 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D.,** M. McVey, J.J. Sekelsky. 2003. *Drosophila* BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science*. 299: 265-267.
- Aijaz S.,** M.S. Balda, and K. Matter. 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol*. 248:261-298.
- Alberts, B.,** A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molekular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: *Garland Publishing*.
- Anderson J.M.,** C.M. Van Itallie, and A.S. Fanning. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*. 16:140-145.
- Angelow, S.,** R. Ahlstrom, and A.S.L. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*. 295:867-876.
- Asano A.,** K. Asano, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium. *Curr Biol*. 13:1042-1046.
- Ashburner, M..** 1989. *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. 1st edition. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Bachmann A.,** M. Schneider, E. Theilenberg, F. Grawe, and E. Knust. 2001. *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature*. 414:638-643.
- Bateman A.,** E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Eddy, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, and E.L. Sonnhammer. 2002. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. 30:276-280.



- Barker, P.M., and R.E. Olver.** 2002. Invited review: Clearance of lung liquid during the perinatal period. *J Appl Physiol.* 93:1542-1548.
- Bazzoni, G..** 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 15:525-530.
- Behr, M., D. Riedel, and R. Schuh.** 2003. The claudin-like *megatrachea* is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 4:611-620.
- Beitel, G.J., and M.A. Krasnow.** 2000. Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system. *Development.* 127:3271-3282.
- Bellaiche, Y., V. Mogila, and N. Perrimon.** 1999. I-SceI Endonuclease, a New Tool for Studying DNA Double-Strand Break Repair Mechanisms in *Drosophila*. *Genetics Society of America.* 152:1037-1044.
- Bellen H.J., Y. Lu, R. Beckstead, and M.A. Bhat.** 1998. Neurexin IV, caspr and paranodin—novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci.* 21:444-449.
- Ben-Yosef, T., I.A. Belyantseva, T.L. Saunders, E.D. Hughes, K. Kawamoto, C.M. Van Itallie, L.A. Beyer, K. Halsey, D.J. Gardner, E.R. Wilcox, J. Rasmussen, J.M. Anderson, D.F. Dolan, A. Forge, Y. Raphael, S.A. Camper, T.B. Friedman.** 2003. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet.* 15:2049-2061.
- Bhat M.A..** 2003. Molecular organization of axo-glial junctions. *Curr Opin Neurobiol.* 13:552-559.
- Bischof, J., R.K. Maeda, M. Hediger, F. Karch, and K. Basler.** 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific  $\varphi$  C31 integrases. *PNAS.* 104:3312-3317.

- Black J.L. III.** 2003. The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr.* 35:649-660.
- Brand, A.H., and N. Perrimon.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 118:401-415.
- Carlson S.D., J.L. Juang, S.L. Hilgers, and M.B. Garment.** 2000. Blood barriers of the insect. *Annu Rev Entomol.* 45:151-174.
- Cereijido, M., R.G. Contreras, L. Shoshani, D. Flores-Benitez, and I. Larre.** 2008. Tight junction and polarity interaction in the epithelial phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778:770-793.
- Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada.** 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778:588-600.
- Colegio, O.R., C. Van Itallie, C. Rahner, and J.M. Anderson.** 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284:1346-1354.
- D'Atri, F., and S. Citi.** 2002. Molecular complexity of vertebrate tight junctions. *Molecular membrane Biology.* 19:103-112.
- D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin.** 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 280:26233-26240.
- Denholm B., V. Sudarsan, S. Pasalodos-Sanchez, R. Artero, P. Lawrence, S. Maddrell, M. Baylies, and H. Skaer.** 2003. Dual origin of the renal tubules in *Drosophila*: mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr Biol.* 13:1052-1057.

- Dietzl G.,** D. Chen, F. Schnorrer, K.-C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblaue, A. Couto, V. Marra, K. Keleman, and B.J. Dickson. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. 448:151-156.
- Ebnet K.,** A. Suzuki, S. Ohno, and D. Vestweber. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 117:19-29.
- Engels, W.R..** 2000. Reversal of fortune for *Drosophila* geneticists? *Science*. 288:1973-1975.
- Fanning A.S.,** L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*. 10:1337-1345.
- Farquhar M.G., and G.E. Palade.** 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 17:375-412.
- Findley, M.K., and M. Koval.** 2009. Regulation and Roles for claudin-family Tight Junction Proteins. *Life*. 61:431-437.
- Fire, A.,** S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-811.
- Fujibe M.,** H. Chiba, T. Kojima, T. Soma, T. Wada, T. Yamashita, and N. Sawada. 2004. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res*. 295:36-47.
- Furuse M.,** T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 123:1777-1788.

- Furuse, M.,** K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions wiht no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141:1539-1550.
- Furuse M.,** M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156:1099-1111.
- Furuse, M., and S. Tsukita.** 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends in Cell Biology.* 16:181-188.
- Gerlach, N..** Dissertation Braunschweig 2006. Untersuchung der Claudin-Proteinfamilie in *Drosophila*.
- Gibson M.C., and N. Perrimon.** 2003. Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol.* 15:747-752.
- Gloor, G.B.,** R.W. Phillis, C.R. Preston, D.M. Johnson-Schultz, N.A. Nassif, R.W. Phillis, W.K. Benz, H.M. Robertson, and W.R. Engels. 1993. Type 1 repressors of P-element mobility. *Genetics.* 135: 81-95.
- Gong, W.J., and K.G. Golic.** 2003. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *PNAS.* 100:2556-2561.
- Gong, W.J., and K.G. Golic.** 2004. Genomic Deletions of the *Drosophila melanogaster* *Hsp70* Genes. *Genetics Society of America.* 168:1467-1476.
- Gonzalez-Mariscal L.,** A. Betanzos, P. Nava, and B.E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81:1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L.,** R. Tapia, and D. Chamorro. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1778:729-756.

- Gow A.,** C.M. Southwood, J.S. Li, M. Pariali, G.P. Riordan, S.E. Brodie, J. Danias, J.M. Bronstein, B. Kachar, and R.A. Lazzarini. 1999. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/ claudin-11 null mice. *Cell*. 99:649-659.
- Groth, A.C.,** M. Fish, R. Nusse, and M.P. Calos. 2004. Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase From Phage  $\phi$ C31. *Genetics*. 166:1775-1782.
- Guillemot, L.,** S. Paschoud, P. Pulimeno, A. Foglia, and S. Citi. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and signaling center. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778:601-613.
- Greenspan, R..** 1997. Fly Punshing. 1st edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hadj-Rabia S.,** L. Baala, P. Vabres, D. Hamel-Teillac, E. Jacquemin, M. Fabre, S. Lyonnet, Y. De Prost, A. Munnich, M. Hadchouel, and A. Smahi. 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*. 127:1386-90. Erratum in: *Gastroenterology*. 2005 128:524.
- Hamazaki, Y.,** M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 2002. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*. 277:455-461.
- Harder, B..** Dissertation Braunschweig 2009. Funktionelle Analyse von epithelialen Transmembranproteinen bei *Drosophila melanogaster*.
- Hartsock, A., and W.J. Nelson.** 2008. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778:660-669.

- Horn, C., and A.M. Handler.** 2005. Site-specific genomic targeting in *Drosophila*. *PNAS*. 102:12483-12488.
- Hortsch, M., and B. Margolis.** 2003. Septate and paranodal junctions: kissing cousins. *Trends in Cell Biology*. 13:557-561.
- Ishizaki, T., H. Chiba, T. Kojima, M. Fujibe, T. Soma, H. Miyajima, K. Nagasawa, I. Wada, and N. Sawada.** 2003. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of *claudin-5* gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Experimental Cell Research*. 290:275-288.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita.** 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 147:1351-1363.
- Itoh, M., H. Sasaki, M. Furuse, H. Ozaki, T. Kita, and S. Tsukita.** 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol.* 154:491-497.
- Kellenberger, S., and L. Schild.** 2002. Epithelial sodiumchannel/degnerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev.* 82:735-767.
- Knust E., and O. Bossinger.** 2002. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science*. 298:1955-1959.
- Köhler, G., and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495-497.
- Kohler K., and A. Zahraoui.** 2005. Tight junction: a co-ordinator of cell signalling and membrane trafficking. *Biol Cell*. 97:659-665.

- Kollmar R.,** S.K. Nakamura, J.A. Kappler, and A.J. Hudspeth. 2001. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10196-10201.
- Krämer, H..** 2000. The ups and downs of life in an epithelium. *J Cell Biol.* 151:F15-F18.
- Lal-Nag, M., and P.J. Morin.** 2009. The claudins. *Genome Biology.* 10:235.
- Lamb, R.S.,** R.E. Ward, L. Schweizer, and R.G. Fehon. 1998. *Drosophila* coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 12:3505-3519.
- Lecuit T., and E. Wieschaus.** 2000. Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo. *J Cell Biol.* 150:849-860.
- Liu, L.,** W.A. Johnson, and M.J. Welsh. 2003. *Drosophila* DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:2128-2133.
- Longo-Guess, C.M.,** L.H. Gagnon, B. Fritsch, and K.R. Johnson. 2007. Targeted knockout and lacZ reporter expression of the mouse *Tmhs* deafness gene and characterization of the *hscy-2J* mutation. *Mamm Genome.* 18:646–656.
- Loureiro J., and M. Peifer.** 1998. Roles of Armadillo, a *Drosophila* catenin, during central nervous system development. *Curr Biol.* 8:622-632.
- Luschnig, S.,** T. Bätz, K. Armbruster, and M.A. Krasnow. 2006. serpentine and vermiform encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Current Biology.* 16:186-194.
- Manning, G., and M. Krasnow.** 1993. The Development of *Drosophila melanogaster* (eds. Bate, M., and A. Martinez Arias). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 609-685.

- Martin-Padura I.,** S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142:117-127.
- Matter K., and M.S. Balda.** 2003a. Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *J Cell Biol.* 161:459-460.
- Matter K., and M.S. Balda.** 2003b. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:225-236.
- Matter K.,** S. Aijaz, A. Tsapara, and M.S. Balda. 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:453-458.
- Miyamoto, T.,** K. Morita, D. Takemoto, K. Takeuchi, Y. Kitano, T. Miyakawa, K. Nakayama, Y. Okamura, H. Sasaki, Y. Miyachi, M. Furuse, and S. Tsukita. 2005. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 169:527-538.
- Müller, H.A..** 2000. Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn.* 218:52-67.
- Muller, D.,** P.J. Kausalya, F. Claverie-Martin, I.C. Meij, P. Eggert, V. Garcia-Nieto, and W. Hunziker. 2003. A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet.* 73:1293-1301.
- Myster S.H.,** R. Cavallo, C.T. Anderson, D.T. Fox, and M. Peifer. 2003. *Drosophila* p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J Cell Biol.* 160:433-449.



- Nitta T.,** M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 16:653-660.
- Noirot-Timothee C., and C. Noirot.** 1980. Septate and scalariform junctions in arthropods. *Int Rev Cytol.* 63:97-140.
- Notterpek L.,** K.J. Roux, S.A. Amici, A. Yazdanpour, C. Rahner, and B.S. Fletcher. 2001. Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14404-14409.
- Nunbhakdi-Craig, V.,** T. Machleidt, E. Ogris, D. Bellotto, C.L. White III, and E. Sontag. 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol.* 158:967-978.
- Peter, A.,** P. Schöttler, M. Werner, N. Beinert, G. Dowe, P. Burkert, F. Mourkioti, L. Dentzer, Y. He, P. Deak, P.V. Benos, M.K. Gatt, L. Murphy, D. Harris, B. Barrell, C. Ferraz, S. Vidal, C. Brun, J. Demaille, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, V. Lelaure, S. Mottier, F. Galibert, D. Borkova, B. Minana, F.C. Kafatos, S. Bolshakov, I. Sidenkiamos, G. Papagiannakis, L. Spanos, C. Louis, E. Madueno, B. de Pablos, J. Modolell, A. Bucheton, D. Callister, L. Campbell, N.S. Henderson, P.J. McMillan, C. Salles, E. Tait, P. Valenti, R.D.C. Saunders, A. Billaud, L. Pachter, R. Klapper, W. Janning, D.M. Glover, M. Ashburner, H.J. Bellen, H. Jäckle, and U. Schäfer. 2002. Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO reports.* 3:34-38.
- Rahner C.,** L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 120:411-422.
- Rodriguez-Boulau E., and W.J. Nelson.** 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science.* 245:718-725.

- Roh, M.H., C.J. Liu, S. Laurinec, and B. Margolis.** 2002. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem.* 277:27501-27509.
- Rong, Y.S., and K.G. Golic.** 2000a. A Targeted Gene Knockout in *Drosophila*. *Genetics Society of America.* 157:1307-1312.
- Rong, Y.S., and K.G. Golic.** 2000b. Gene Targeting by Homologous Recombination in *Drosophila*. *Science.* 288:2013-2018.
- Rong, Y.S., S.W. Titen, H.B. Xie, M.M. Golic, M. Bastiani, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, M. Brodsky, G.M. Rubin, and K.G. Golic.** 2002. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes & Development.* 16:1568- 1581.
- Rong, Y.S., and K.G. Golic.** 2003. The Homologous Chromosome Is an Effective Template for the Repair of Mitotic DNA Double-Strand Breaks in *Drosophila*. *Genetics Society of America.* 165:1831-1842.
- Rudini, N., and C. Dejana.** 2008. Adherens junctions. *Curr Biol.* 18:1080-1082.
- Ruffer, C., and V. Gerke.** 2004. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol.* 83:135-144.
- Saitou M., M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita.** 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 11:4131-4142.
- Samakovlis, C., and A.E. Uv.** 2004. Tracheal system development and morphogenesis. In *Comprehensive molecular insect science*.
- Sambrook, J..** 1989. *Molecular Cloning*. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sawada, N.,** M. Murata, K. Kikuchi, M. Osanai, H. Tobioka, T. Kojima, and H. Chiba. 2003. Tight junctions and human diseases. *Med. Electron Microsc.* 36:147-156.
- Shabbi, M.I.,** Z.M. Ahmed, S.Y. Khan, S. Riazuddin, A.M. Waryah, S.N. Khan, R.D. Camps, M. Ghosh, M. Kabra, I.A. Belyantseva, T.B. Friedman and S. Riazuddin. 2006. Mutations of human TMHS cause recessively inherited non-syndromic hearing loss. *J Med Genet.* 43:634-640.
- Simske J.S.,** M. Koppen, P. Sims, J. Hodgkin, A. Yonkof, and J. Hardin. 2003. The cell junction protein VAB-9 regulates adhesion and epidermal morphology in *C. elegans*. *Nat Cell Biol.* 5:619-625.
- Soma, T.,** H. Chiba, Y. Kato-Mori, T. Wada, T. Yamashita, T. Kojima, and N. Sawada. 2004. Thr<sup>207</sup> of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Experimental Cell Research.* 300:202-212.
- Spiegel I., and E. Peles.** 2002. Cellular junctions of myelinated nerves. *Mol Membr Biol.* 19:95-101.
- Takeda Y.,** T. Notsu, K. Kitamura, and K. Uyemura. 2001. Functional analysis for peripheral myelin protein PASII/PMP22: is it a member of claudin superfamily? *Neurochem Res.* 26:599-607.
- Tepass U.,** E. Gruszynski-DeFeo, T.A. Haag, L. Omatyar, T. Torok, and V. Hartenstein. 1996. Shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes Dev.* 10:672-685.
- Tepass U., and V. Hartenstein.** 1994 The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 161:563-596.
- Tepass U.,** G. Tanentzapf, R. Ward, and R. Fehon. 2001. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 35:747-784.

- Tepass U.** 2003. Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nat Cell Biol.* 5:595-597.
- Tsukita S., and M. Furuse.** 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol.* 49:13-16.
- Turksen, K., and T.C. Troy.** 2004. Barriers built on Claudins. *Journal of Cell Science.* 117:2435-2447.
- Van Itallie C.M., and J.M. Anderson.** 2004. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology.* 19:331-338.
- Van Itallie, C.M., O.R. Colegio, and J.M. Anderson.** 2004. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol.* 199:29-38.
- Van Itallie C.M., T.M. Gambling, J.L. Carson, and J.M. Anderson.** 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci.* 118:1427-1436.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson.** 2006. Claudins and Epithelial Paracellular Transport. *Annual Review of Physiology.* 68:403-429.
- Wang, S., S.A. Jayaram, J. Hemphälä, K.-A. Senti, V. Tsarouhas, H. Jin, and C. Samakovlis.** 2006. Septate-Junction-Dependent Luminal Deposition of Chitin Deacetylases Restricts Tube Elongation in the *Drosophila* Trachea. *Current Biology.* 16:180-185.
- Ward, R.E. 4th, L. Schweizer, R.S. Lamb, and R.G. Fehon.** 2001. The protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of *Drosophila* Coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development and imaginal cell proliferation. *Genetics.* 159:219-228.

- Wu, V.M.,** J. Schulte, A. Hirschi, U. Tepass, and G.J. Beitel. 2004. Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J Cell Biol.* 164:313-323.
- Xie, H.B., and K.G. Golic.** 2004. Gene Deletion by Ends-In Targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Society of America.* 168:1477-1489.
- Yamauchi, K.,** T. Rai, K. Kobayashi, E. Sohara, T. Suzuki, T. Itoh, S. Suda, A. Hayama, S. Sasaki, and S. Uchida. 2004. Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *PNAS.* 101:4690-4694.
- Yao, J.,** T. Oite, and M. Kitamura. 2009. Gap junctional intercellular communication in the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:939-946.

## 6 Zusammenfassung

Claudine sind essentielle *tight junctions* Transmembranproteine in Vertebraten und sind lebensnotwendig in *septate junctions* von Invertebraten. Während in Vertebraten 24 Proteine zur Gruppe der Claudine zählen, konnte in dieser Arbeit durch Sequenzvergleiche sowie genetische und molekularbiologische Methoden die Gruppe der Claudine auf die Proteine Megatrachea, Sinuous und Sesam eingegrenzt werden.

Die molekulare Analyse von *sesam* Allelen führte zur Identifizierung lebenswichtiger Aminosäuren im extrazellulären Bereich von Sesam. Eine der Mutationen führte zum Austausch einer Aminosäure in einem von Vertebraten bis Invertebraten konservierten Proteinmotivs und unterstreicht damit die essentielle Bedeutung dieses Motivs.

Neben der gleichen Lokalisation der *Drosophila* Claudine in *septate junctions* zeigen Mutantenanalysen auch gleiche Rollen der Claudine für die transepitheliale Barriere und die Morphogenese des Tracheensystems. Nur hochauflösende elektronenmikroskopische Analysen offenbaren unterschiedliche Funktionen der *Drosophila* Claudine für die Feinstruktur der *septate junctions* und der tenidalen Falten im Tracheenlumen.

Weiterhin wurde eine definierte *mega lack-of-function* Mutante generiert, in welcher der *mega* Genbereich durch das *white*-Gen mit zwei flankierenden att-Sites ersetzt ist. Die att-Sites erlauben einen gezielten, effizienten und schnellen Austausch des *white*-Gens gegen modifizierte *mega* Gensequenzen. Die Mutante bildet somit die Grundlage für die *in vivo* Analyse *in vitro* generierter *mega* Genkonstrukte am ursprünglichen *mega* Genort.